



João Diogo Encarnação Bastos de Miranda

Licenciado em Ciências de Engenharia Biomédica

***Carbon Dots: Nanopartículas de carbono fluorescentes
para marcação e visualização de células***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre
em Engenharia Biomédica

Orientador: Jorge Carvalho e Silva, Professor Auxiliar, FCT-UNL

Co-orientador: António Jorge Dias Parola, Professor Associado, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Carla Maria Quintão Pereira

Arguente: Prof. Doutor João Carlos dos Santos Silva e Pereira de Lima

Vogal: Prof. Doutor Jorge Alexandre Monteiro de Carvalho e Silva



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Dezembro, 2014

João Diogo Encarnação Bastos de Miranda

Licenciado em Ciências de Engenharia Biomédica

Carbon Dots: Nanopartículas de carbono fluorescentes
para marcação e visualização de células

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre
em Engenharia Biomédica

Orientador: Jorge Carvalho e Silva, CEFITEC, Professor Auxiliar, Departamento de Física da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: António Jorge Dias Parola, REQUIMTE, Professor Associado, Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Membros do Júri:

Presidente: Prof. Doutora Carla Maria Quintão Pereira

Arguente: Prof. Doutor João Carlos dos Santos Silva e Pereira de Lima

Vogal: Prof. Doutor Jorge Alexandre Monteiro de Carvalho e Silva

Carbon Dots: Nanopartículas de carbono fluorescentes **para marcação e visualização de células**

Copyright © 2014 – Todos os direitos reservados. João Diogo Encarnação Bastos de Miranda, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Quero começar por agradecer à minha família, em especial aos meus pais, avós e irmão, por todo o apoio incondicional, paciência e confiança que me transmitiram em todas as fases da minha vida. Todo o apoio que me deram foi fundamental para que me tornasse na pessoa que sou hoje e tudo o que alcancei foi possível graças a eles.

Quero agradecer ao professor Jorge Carvalho e Silva e ao professor António Jorge Parola, respectivamente, meu orientador e co-orientador desta tese de mestrado, pela oportunidade de trabalhar num tema muito contemporâneo e verdadeiramente fascinante. Todo o apoio e conhecimento que me facultaram foram de importância capital no decorrer deste trabalho. Ambos sempre se mostraram disponíveis para ajudar a encontrar soluções para qualquer dificuldade surgisse, formulando críticas válidas e sugestões essenciais para as ultrapassar. Quero mostrar o meu profundo agradecimento pela oportunidade de trabalhar no GREAT e pela oportunidade de trabalhar juntamente com o grupo de fotoquímica. Quero ainda agradecer a oportunidade de participação na conferência IC3EM.

Ao grupo de fotoquímica – Artur Moro, João Avó, Raquel Gavara, Noémi Jordão, João Lima, Luís Cabrita, César Laia, Sandra Gago, Ana Diniz, Alexandra Costa, Fernando Pina, Maria João Melo, Nuno Trindade, Nuno Basílio, Andreia Forte e Hugo – um muito obrigado por me terem acolhido no seu grupo e por me darem a oportunidade de trabalhar num ambiente que prima pelo profissionalismo, rigor e também pela boa disposição. Todos os conselhos, motivação e ensinamentos de práticas laboratoriais essenciais no desenrolar deste trabalho. Um obrigado especial ao Artur, João Avó, César, Noémi e Nuno Basílio pela disponibilidade, prontidão, paciência e tempo dispendido comigo no laboratório. Quero também agradecer ao Alfonso e à Alicia, que trabalharam com o grupo de fotoquímica, pelo companheirismo e boa disposição.

Quero agradecer ao professor João Sotomayor por me autorizar a usar a mufla do seu laboratório e às raparigas do laboratório 415 – Ana, Catarina, Nélia e Mariana – pela grande simpatia que sempre me mostraram.

Agradeço ao pessoal do GREAT – Nuno, Constança, Ana Carolina e Tânia – pelo excelente ambiente e companheirismo durante o decorrer deste projecto.

Quero mostrar a minha gratidão para com o professor João Paulo Borges e à doutoranda Ana Baptista pela simpatia e por me permitirem utilizar a mufla do laboratório de biomateriais. Agradeço à investigadora Luísa Maia e à investigadora Ana Teresa Lopes do laboratório 407 por me disponibilizarem a centrífuga, os tubos de centrífuga e membrana de diálise.

Agradeço aos meus amigos mais chegados – Cedric, Luís, Nuno e João – pela grande amizade.

A todos os meus amigos de curso e faculdade que se tornaram parte da minha vida ao longo deste percurso e que transformaram a minha vivência académica numa experiência incrível de valor inestimável.

Para finalizar quero deixar um grande obrigado à Ana Luísa pela inabalável confiança, apoio, motivação e amor que me transmite há já quase 5 anos. A sua presença foi crucial para reendireitar a minha vida académica na direcção certa.

A todos vós, muito obrigado.

Resumo

A imagiologia por fluorescência é uma técnica extremamente útil em investigação biomédica. Actualmente existe uma vasta gama de fluoróforos disponíveis para marcação por fluorescência. Contudo estes marcadores possuem limitações que condicionam a sua aplicação em sistemas biológicos. As nanopartículas de carbono fluorescentes (CNPs) constituem uma recente classe de marcadores fluorescentes com elevada biocompatibilidade. O objectivo deste trabalho consistiu em produzir de CNPs através de métodos simples, a sua caracterização e aplicação como marcadores celulares para visualização de células em microscopia de fluorescência.

Inicialmente foram produzidas nanopartículas (NPs) seguindo métodos mencionados na literatura. Seguidamente foram produzidas CNPs a partir de PAA, por via hidrotérmica, e a partir da carbonização de grãos de cortiça para as quais foi feito um estudo do efeito da variável temperatura de carbonização. Das amostras produzidas, nove foram devidamente estudadas.

A espectroscopia de absorção no UV-Vis revelou perfis de absorção característicos para este tipo de NPs. A emissão de fluorescência das CNPs caracterizada por espectroscopia de fluorescência evidenciou comportamentos emissivos típicos destas NPs tais como dependência do máximo de emissão com o comprimento de onda de excitação. A intensidade da fluorescência das CNPs sintetizadas por via hidrotérmica é, em geral, maior com rendimentos quânticos de fluorescência a variar entre 4 e 11%. Os rendimentos quânticos das CNPs produzidas por carbonização variam entre 2 e 5%.

As imagens de microscopia electrónica demonstram que as CNPs possuíam formas esféricas. Os tamanhos determinados por SEM, TEM e DLS revelaram que as dimensões das NPs caem entre os 2 e 150nm. Por DRX constatou-se que as CNPs possuem uma estrutura atómica desorganizada.

A análise FTIR mostrou que as amostras de CNPs produzidas a partir de macromoléculas pelo método hidrotérmico possuíam uma grande quantidade de precursor não degradado. Para as restantes CNPs foi verificada a presença de grupos funcionais polares que lhes conferem solubilidade em meio aquoso. Com ^1H -RMN verificou-se uma diminuição de grupos alifáticos e aumento de grupos aromáticos nas CNPs de cortiça carbonizada, com o aumento da temperatura de carbonização. O potencial ζ da amostra obtida com maior temperatura de carbonização foi -25,7mV.

Nos estudos *in vitro* realizados apenas as NPs produzidas a partir de ácido cítrico e etilenodiamina por via hidrotérmica marcaram eficazmente as linhas celulares de osteoblastos e de fibroblastos. A eficiência da marcação aparenta ser dependente do tempo de incubação com CNPs.

Palavras chave: fluorescência, nanopartículas de carbono fluorescentes, cortiça, marcadores fluorescentes, marcadores celulares, microscopia de fluorescência.

Abstract

Fluorescence imaging is widely used in biomedical research. Although there are many fluorophores currently available, most of these markers are unsuitable for biological applications. Fluorescent carbon nanoparticles (CNPs) are an emergent class of highly biocompatible fluorescent labels with great potential for bioimaging. The purpose of this work was the production CNPs through simple routes, their characterization and their application as cell labels for fluorescence microscopy imaging.

In a first phase, nanoparticles (NPs) were produced through existing procedures. After these syntheses, CNPs were produced from PAA, through a hydrothermal procedure, and through the carbonization of cork grain where the influence of the carbonization temperature was investigated. A total of nine CNPs samples were thoroughly studied.

UV-Vis absorption spectroscopy showed the characteristic absorption profiles for this type of NPs. Fluorescence behavior was studied by fluorescence spectroscopy and revealed the typical fluorescence emission behavior expected for these NPs such as excitation wavelength dependent emission maxima. Calculation of fluorescence quantum yields revealed that CNPs synthesized through hydrothermal procedures are more emissive, with fluorescence quantum yields ranging between 4 and 11%. Fluorescence quantum yield of CNPs produced from dry carbonization of biomass vary from 2 to 5%.

The images obtained by electron microscopy techniques showed that most CNPs have spherical shapes. Most sizes, determined by SEM, TEM and DLS, range between 2 and 150nm. XRD analysis revealed an amorphous nature for the synthesized CNPs.

The chemical structure of all CNPs samples was investigated with FTIR. The analysis showed that CNPs samples produced from macromolecules via hydrothermal procedure retain a great deal of non-degraded precursor. For the remaining CNPs, polar functional groups were distinguished. These groups are responsible for CNPs water solubility. Furthermore, for CNPs obtained from the carbonization of cork, structural analysis performed by ^1H -RMN showed a likely decrease in aliphatic groups and an increase in aromatic groups. Of these samples, the CNPs synthesized with the highest temperature had a ζ potential of -25,7mV.

The *in vitro* studies performed showed that only CNPs produced from citric acid and ethylenediamine through hydrothermal procedure were efficient cell labels for fibroblasts and osteoblasts cell lines. The labeling efficiency seems to be time-dependent.

Key-words: fluorescence, fluorescent carbon nanoparticles, fluorescent labels, cork, cell labels, fluorescence microscopy.

Índice de matérias

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice de figuras	xv
Índice de tabelas	xix
Lista de abreviaturas e símbolos	xxi
Capítulo I – Enquadramento teórico	1
I.1 Introdução ao tema.....	1
I.2 Fluorescência	1
I.2.1 Conceito	1
I.2.2 Princípio físico	2
I.2.2.1 Absorção e excitação electrónica	2
I.2.2.2 Relaxação electrónica e emissão de fluorescência	3
I.3 O microscópio de fluorescência	4
I.3.1 Contextualização	4
I.3.2 Fundamentos de microscopia de epifluorescência	5
I.4 Marcadores fluorescentes	6
I.4.1 Fluoróforos orgânicos.....	6
I.4.2 Proteínas e péptidos fluorescentes	7
I.4.3 Nanopartículas fluorescentes	7
I.4.3.1 Quantum Dots.....	8
I.4.3.2 Nanopartículas metálicas fluorescentes	9
I.4.3.3 Nanocristais de Silício	9
I.4.4 Propriedades espectroscópicas e físico-químicas	9
I.5 Nanopartículas de carbono	10
I.5.1 Introdução	10
I.5.2 Métodos de síntese de nanopartículas de carbono.....	11
I.5.3 Mecanismo de fluorescência das nanopartículas de carbono	12
I.5.4 Propriedades das nanopartículas de carbono.....	12
I.5.4.1 Propriedades físico-químicas	13
I.5.4.2 Propriedades espectroscópicas.....	13
I.5.5 Aplicações das nanopartículas de carbono.....	14

I.5.5.1 Bioimagiologia	15
I.5.5.2 Aplicações bioanalíticas	16
Capítulo II – Parte experimental.....	17
II.1 Síntese	17
II.1.1 Preâmbulo	17
II.1.2 Reagentes usados em síntese	17
II.1.3 Materiais usados em síntese	18
II.1.4 Equipamentos usados em síntese.....	18
II.1.5 Procedimentos.....	18
II.1.5.1 Síntese hidrotérmica	18
II.1.5.2 Carbonização simples	19
II.2 Caracterização	20
II.2.1 Espectroscopia de absorção.....	20
II.2.2 Espectroscopia de fluorescência.....	21
II.2.2.1. Medição de rendimentos quânticos de fluorescência	22
II.2.3 Microscopia electrónica de transmissão	22
II.2.4 Microscopia electrónica de varrimento	23
II.2.5 Dispersão dinâmica da luz.....	23
II.2.6 Difrração por raios-X.....	24
II.2.7 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....	25
II.2.8 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton	25
II.2.9 Potencial Zeta	26
II.3 Culturas celulares e imagiologia celular	27
II.3.1 Reagentes.....	27
II.3.2 Materiais	27
II.3.3 Equipamentos.....	27
II.3.4 Culturas celulares e marcação	27
II.3.5 Visualização no microscópio de fluorescência	28
Capítulo III – Resultados e discussão	29
III.1 Sínteses	29
III.1.1 Síntese hidrotérmica	29
III.1.2 Carbonização simples	30
III.2 Caracterização	31
III.2.1 Caracterização espectroscópica.....	32

III.2.1.1 Espectroscopia de absorção no ultravioleta e visível	32
III.2.1.2 Espectroscopia de fluorescência.....	34
III.2.2 Caracterização morfológica	42
III.2.2.1 Microscopia electrónica de transmissão	42
III.2.2.2 Microscopia electrónica de varrimento	44
III.2.2.3 Dispersão dinâmica da luz	46
III.2.2.4 Difraccção por raios-X	48
III.2.3 Caracterização da estrutura química	49
III.2.3.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	49
III.2.3.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão	56
III.2.3.3 Potencial Zeta	59
III.3 Marcações celulares	59
III.3.1 Linhas celulares Saos-2.....	59
III.3.2 Linhas celulares HFFF2	61
Capítulo IV – Conclusões e perspectivas futuras	67
Referências bibliográficas.....	71
Apêndices.....	77
Apêndice A – Análise estrutural de precursores moleculares e CNPs	77
Apêndice B – Características da cortiça	82
Apêndice C – Preparação e caracterização espectroscópica da solução de sulfato de quinino	84
Apêndice D – Culturas celulares	85
Apêndice E – Controlos de autofluorescência celular.....	87
Apêndice F – Tentativa de funcionalização com hidrocloreto de L-cisteína-etil-éster	88

Índice de figuras

Figura I.1 – Transição electrónica mais provável. Adaptado de [5].	3
Figura I.2 – Diagrama de Jablonski: excitação e mecanismos de relaxação electrónica.	3
Figura I.3 – Células da aorta de ratinhos marcadas com fluoróforos orgânicos (A). Actina marcada com Alexa Fluor 350 (azul), Tubulina marcada com Alexa Fluor 568 (vermelho) e DNA marcado com SYTOX Green. Células HeLa marcadas com QDs (B). Tubulina marcada com QDot525 (verde), complexo de Golgi marcado com QDot585 (amarelo) e histonas marcadas com QDot655 (vermelho). Adaptado [2].	4
Figura I.4 – Espectro de emissão de lâmpada de mercúrio (A) e montagem do bloco óptico num microscópio de epifluorescência (B). Adaptado de [2].	5
Figura I.5 – Estrutura química da rodamina B (A), fluoresceína (B) e azul do nilo (C). Estruturas desenhadas com o <i>software</i> ChemDraw.	6
Figura I.6 – Soluções de QDs à luz UV. QDs com tamanhos mais pequenos correspondem a deslocamento da emissão para o azul. Adaptado de [13].	8
Figura I.7 – Ilustração de CNPs com superfície passivada com grupos oxigenados (esquerda) e com superfície passivada com moléculas orgânicas (direita). Adaptado de [22].	11
Figura I.8 – Marcação com CNPs produzidas por micro-ondas a partir de glicerol e 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamina em células HepG-2. Adaptado de [40].	15
Figura I.9 – Imagem <i>in vivo</i> de fluorescência de CNPs injectadas por via intravenosa em ratinhos: a) imagem por contraste de fase; b) imagem de fluorescência; c) imagem de intensidade de fluorescência codificada por cores. Adaptado de [42].	15
Figura II.1 – Reactor de teflon com capacidade para cerca de 150ml (esquerda) e respectiva câmara de aço inoxidável (direita).	18
Figura II.2 – Esquema de funcionamento de um espectrofluorímetro de duplo monocromador. Adaptado de [50].	21
Figura II.3– Esquema da distribuição de cargas devido a uma partícula carregada. Adaptado de [51].	26
Figura III.1 – Cortiça em pó (A), carbonizada: a 180°C (B), 220°C (C), 260°C (D) e 300°C (E).	30
Figura III.2 – Espectro de absorção de CNPs PVP.	32
Figura III.3 – Espectro de absorção de CNPs AC E.	32
Figura III.4 – Espectro de absorção de CNPs PAA.	33

Figura III.5 – Espectro de absorção de CNPs G.	33
Figura III.6 – Espectro de absorção de CNPs CL.	33
Figura III.7 – Espectros de absorção de CNPs 180.	33
Figura III.8 – Espectro de absorção de CNPs 220.	33
Figura III.9 – Espectro de absorção de CNPs 260.	33
Figura III.10 – Espectro de absorção de CNPs 300.	34
Figura III.11 Espectros de fluorescência de CNPs PVP (A) e respectivos espectros normalizados (B).	35
Figura III.12 – Espectros de fluorescência de CNPs AC E (A) e respectivos espectros normalizados (B).	35
Figura III.13 – Espectros de fluorescência de CNPs PAA (A) e respectivos espectros normalizados (B).	35
Figura III.14 – Espectros de fluorescência de CNPs G (A) e respectivos espectros normalizados (B).	36
Figura III.15 – Espectros de fluorescência de CNPs CL (A) e respectivos espectros normalizados (B).	36
Figura III.16 – Espectros de fluorescência de CNPs 180 (A) e respectivos espectros normalizados (B).	36
Figura III.17 – Espectros de fluorescência de CNPs 220 (A) e respectivos espectros normalizados (B).	37
Figura III.18 – Espectros de fluorescência de CNPs 260 (A) e respectivos espectros normalizados (B).	37
Figura III.19 – Espectros de fluorescência de CNPs 300 (A) e respectivos espectros normalizados (B).	37
Figura III.20 – Espectros de excitação de CNPs PVP.	40
Figura III.21 – Espectros de excitação de CNPs AC E.	40
Figura III.22 – Espectros de excitação de CNPs PAA.	40
Figura III.23 – Espectros de excitação de CNPs G.	40
Figura III.24 – Espectros de excitação de CNPs CL.	40
Figura III.25 – Espectros de excitação de CNPs 180.	40

Figura III.26 – Espectros de excitação de CNPs 220.	41
Figura III.27 – Espectros de excitação de CNPs 260.	41
Figura III.28 – Espectros de excitação de CNPs 300.	41
Figura III.29 – Imagem TEM de CNPs PVP.	43
Figura III.30 – Imagem TEM de CNPs G.	43
Figura III.31 – Imagem TEM de CNPs 260. O filme fino formado enrolou em direcção ao cobre. ...	43
Figura III.32 – Imagem TEM de CNPs 300.	43
Figura III.33 – Imagem SEM de CNPs PVP.	44
Figura III.34 – Imagem SEM de CNPs CL.	44
Figura III.35 – Imagem SEM de CNPs 180.	44
Figura III.36 – Imagem SEM de CNPs 220.	44
Figura III.37 – Imagem SEM de CNPs AC E.	45
Figura III.38 – Histograma de dimensões de CNPs AC E.	45
Figura III.39 – Imagem SEM de CNPs G.	45
Figura III.40 – Histograma de dimensões de CNPs G.	45
Figura III.41 – Imagem SEM de CNPs 300.	45
Figura III.42 – Histograma de dimensões de CNPs 300.	45
Figura III.43 – Distribuição de tamanhos DLS de CNPs PVP (A), CNPs CL (B) e CNPs 300 (C). ...	47
Figura III.44 – Difractograma de CNPs PVP.	48
Figura III.45 – Difractograma de CNPs AC E.	48
Figura III.46 – Difractograma de CNPs PAA.	48
Figura III.47 – Difractograma de CNPs G.	48
Figura III.48 – Difractograma de CNPs CL.	48
Figura III.49 – Difractogramas de CNPs 180, CNPs 220, CNPs 260 e CNPs 300.	48
Figura III.50- Espectro FTIR de CNPs PVP.	50
Figura III.51 – Espectro FTIR de CNPs AC E.	51

Figura III.52 – Espectro FTIR de CNPs CL.	52
Figura III.53 – Espectro FTIR de CNPs 180.	53
Figura III.54 – Espectro FTIR de CNPs 260.	54
Figura III.55 – Espectro FITR de CNPs 300.	55
Figura III.56 – Espectro ¹ H-RMN de CNPs 180. O <i>inset</i> exibe a região aromática ampliada.	57
Figura III.57 – Espectro ¹ H-RMN de CNPs 220. O <i>inset</i> exibe a região aromática ampliada.	57
Figura III.58 - Espectro ¹ H-RMN de CNPs 260. Em <i>inset</i> é exibida a região aromática ampliada. ..	58
Figura III.59 – Imagens de microscopia de epifluorescência de células Saos-2 marcadas com CNPs AC E (concentração de CNPs em meio de incubação: 1mg/ml). As imagens A e C foram obtidas com luz excitatória no UV próximo e as imagens B e D com luz azul. Ampliação: A e B de 100× e C e D de 400×. As imagens foram adquiridas com tempos de exposição de 1s. ...	60
Figura III.60 – Imagens de microscopia de epifluorescência de fibroblastos marcados com CNPs AC E com tempos de incubação de 24h. CNPs internalizadas a concentrações de 0,5mg/ml (A) e 1mg/ml (B) com excitação no UV próximo e ampliação de 100×. CNPs internalizadas a concentrações de 0,5mg/ml (C) e 1mg/ml (D) com excitação no azul e ampliação de 400×. As imagens foram adquiridas com exposição de 1s.	62
Figura III.61 – Imagens de microscopia de epifluorescência de fibroblastos marcados com CNPs CL com tempos de incubação de 24h. CNPs internalizadas a concentrações de 0,5mg/ml (A) e 1mg/ml (B) com excitação no UV próximo e ampliação de 100×. As imagens foram adquiridas com tempos de exposição de 1s.	63
Figura III.62 – Imagens de microscopia de epifluorescência de fibroblastos marcados com CNPs AC E com tempos de incubação de 72h. CNPs internalizadas a concentrações de 0,5mg/ml (A, C e E) e 1mg/ml (B, D e F) com excitação no UV próximo (A e B) azul (C e D) e verde (E e F) – excitação no verde: 528 a 553nm. Ampliação de 400× em todas as imagens. Tempos de exposição na aquisição: 0,5s (A, C e E) e 1s (B, D e F).	64
Figura III.63 – Imagens de microscopia de epifluorescência de fibroblastos marcados com CNPs 180 (A), CNPs 220 (B) e CNPs 300 (C). A alíquota usada em todas as marcações foi de 0,3mL. Os espécimes foram excitados com luz azul. A magnificação usada é de 100×. Os tempos de exposição para adquirir as imagens foram de 3s (A e C) e 2s (B).	65

Índice de tabelas

Tabela I.1 – Comparação de características entre marcadores. Adaptado de [5].	10
Tabela I.2 – Aplicações de CNPs em detecção de sais inorgânicos. Adaptado de [43].	16
Tabela I.3 – Aplicações de CNPs para detectar moléculas biológicas e orgânicas. Adaptado de [43].	16
Tabela II.1 – Tabela dos reagentes usados em síntese.	17
Tabela II.2 – Condições em sínteses hidrotérmicas.	19
Tabela II.3 – Parâmetros na produção de CNPs a partir da carbonização de cortiça.	20
Tabela II.4 – Concentrações usadas em espectroscopia de absorção e espectroscopia de fluorescência.	21
Tabela III.1 – Resultados de reacções hidrotérmicas.	29
Tabela III.2 – Resultados das carbonizações. ^(a) Calculado com base na massa medida depois da secagem de uma alíquota de 5ml.	30
Tabela III.3 – Concentrações aparentes das soluções de CNPs obtidas por carbonização de cortiça.	31
Tabela III.4 – Técnicas de caracterização utilizadas (FS=Espectroscopia de fluorescência; S=Sim; N = Não; S.S. = Sem Sinal).	32
Tabela III.5 – Parâmetros espectroscópicos de emissão das CNPs obtidas por síntese hidrotérmica.	38
Tabela III.6 – Parâmetros espectroscópicos de emissão das CNPs obtidas por carbonização simples.	39
Tabela III.7 – Tamanhos de CNPs PVP.	43
Tabela III.8 – Tamanhos de CNPs G.	43
Tabela III.9 – Tamanhos de CNPs 260.	43
Tabela III.10 – Tamanhos de CNPs 300.	43
Tabela III.11 – Tamanhos de CNPs PVP.	44
Tabela III.12 – Tamanhos de CNPs CL.	44
Tabela III.13 – Tamanhos de CNPs 180.	44

Tabela III.14 – Tamanhos de CNPs 220.....	44
Tabela III.15 – Medições obtidas por DLS.....	47
Tabela III.16 – Atribuição de picos a CNPs PVP.	50
Tabela III.17 – Atribuição de picos a CNPs AC E.....	51
Tabela III.18 – Atribuição de picos a CNPs CL.	52
Tabela III.19 – Atribuição de picos a CNPs 180.	53
Tabela III.20 – Atribuição de picos a CNPs 260.	54
Tabela III.21– Atribuição de picos a CNPs 300.	55

Lista de abreviaturas e símbolos

$^1\text{H-RMN}$	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton
CDO	Comprimento de onda
CNPs	Nanopartículas de carbono (do inglês, <i>Carbon Nanoparticles</i>)
DLS	Dispersão dinâmica da luz (do inglês, <i>Dynamic Light Scattering</i>)
DRX	Difracção por raios-X
η	Rendimento
FQY	Rendimento quântico de fluorescência (do inglês, <i>Fluorescence Quantum Yield</i>)
FTIR	Espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (do inglês, <i>Fourier Transform Infrared spectroscopy</i>)
FWHM	Largura a meia altura (do inglês, <i>Full Width at Half Maximum</i>)
GFP	Proteína fluorescente verde (do inglês, <i>Green Fluorescent Protein</i>)
IV	Infravermelho
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
λ_{ex}	Comprimento de onda de excitação
MF	Microscopia de fluorescência
NP	Nanopartícula
NDO	Número de onda
PBS	Phosphate Buffered Saline
QDs	Pontos quânticos (do inglês, <i>Quantum Dots</i>)
R_h	Raio hidrodinâmico
S_0	Estado electrónico fundamental
S_1	Primeiro estado electrónico excitado
SEM	Microscopia electrónica de varrimento (do inglês, <i>Scanning Electron Microscopy</i>)

TEM	Microscopia electrónica de transmissão (do inglês, <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
u.a.	Unidades de absorvância
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

Capítulo I – Enquadramento teórico

I.1 Introdução ao tema

Actualmente a técnica de microscopia de fluorescência (MF) é amplamente usada em investigação clínica e biomédica. O propósito da imagiologia por fluorescência é evidenciar células, estruturas celulares ou biomoléculas que, de outra forma, não seriam detectáveis por serem translúcidas ou de dimensões para lá do limite da difracção da luz. Por intermédio da MF é possível obter imagens de elevado contraste e desta forma estudar estruturas e processos bioquímicos. A MF requer o uso de marcadores fluorescentes e, actualmente, existe um vasto leque de marcadores disponíveis. Muitos destes são específicos a estruturas celulares ou biomoléculas funcionais.

Os fluoróforos orgânicos são o actual estado da arte para marcação por fluorescência mas apresentam limitações, especialmente ao nível da sua foto-estabilidade, toxicidade e por serem dispendiosos. As nanopartículas (NPs) fluorescentes são uma classe de marcadores bastante recente e fascinante. NPs como os *quantum dots* (QDs) apresentam propriedades ópticas extraordinárias: são extremamente emissivas e foto-estáveis. No entanto, por possuírem metais pesados no seu núcleo, nomeadamente cádmio, apresentam o risco da toxicidade inerente a estes metais.

As nanopartículas de carbono (CNPs) são uma das mais recentes classes de NPs fluorescentes. Estas NPs rapidamente geraram interesse devido à semelhança das suas propriedades ópticas com as dos QDs, com vantagem de anular a toxicidade dos metais pesados. Com efeito estas NPs apresentam-se como marcadores biocompatíveis de elevada solubilidade em meio aquoso. Essa solubilidade confere-lhes a oportunidade de aplicação em meio fisiológico. A possibilidade de utilização de métodos de síntese simples e moléculas precursoras de baixo custo na produção destas NPs pode torná-las candidatas ideais para a marcação celular e para aplicações biossensoriais.

O desenvolvimento de métodos simples e económicos de síntese de marcadores fluorescentes é de todo o interesse em ciências biomédicas. O objectivo desta tese é a síntese de CNPs por métodos simples, a sua caracterização espectroscópica, morfológica e estrutural, a sua aplicação *in vitro* para marcação celular e visualização com um microscópio de epifluorescência.

I.2 Fluorescência

I.2.1 Conceito

A luminescência é um fenómeno óptico que ocorre quando um átomo, molécula ou nanoestrutura emite luz num comprimento de onda (CDO) característico após ter sido promovido a um estado electrónico excitado [1]. A transição para um estado electrónico de maior energia requer absorção de energia proveniente de uma fonte externa por parte da matéria [2]. Geralmente a transição para estados electrónicos mais elevados é fruto da absorção de fótons incidentes na matéria

mas existem outras vias de excitação electrónica tais como transições consequentes de reacções químicas, bombardeamento com electrões, etc. A emissão de luz por fluorescência é a transição radiativa resultante da relaxação electrónica para um nível de menor energia com a mesma multiplicidade que é mais estável.

A relaxação electrónica pode dar-se por fluorescência e por outros processos concorrentes. A fluorescência, fosforescência e fluorescência retardada são transições radiativas de relaxação. Adicionalmente a relaxação pode dar-se por transições não radiativas tais como conversão interna, transferência electrónica, transferência protónica, alterações conformacionais, transferências de cargas intramoleculares, transferência de energia para moléculas do meio, entre outras [3]. A fluorescência é um fenómeno probabilístico (tal como as outras vias de de-excitação electrónica) e, portanto, está dependente de diversos parâmetros ambientais e da molécula ou estrutura em questão.

I.2.2 Princípio físico

Para compreender a fluorescência é necessário compreender dois fenómenos físicos distintos: a absorção de energia pela matéria e consequente relaxação. Vamos examinar apenas o caso em que fotões são a fonte de energia externa, ou seja, a excitação por absorção de luz.

I.2.2.1 Absorção e excitação electrónica

A matéria pode ser excitada para um estado electrónico de energia superior ao absorver fotões. A excitação electrónica só acontece se o *quantum* de energia do fotão, ou seja, se a energia associada ao seu CDO for igual à diferença de energia entre os dois estados, uma vez que os níveis de energia são quantizados. A absorção é um processo extremamente rápido (ordem do femtossegundo) e, como resultado, ocorre a transição radiativa entre o nível electrónico inicial e final [3] [4]. Também podem ocorrer transições vibrónicas como resultado da absorção de fotões.

À temperatura ambiente a grande maioria das moléculas encontra-se no estado vibracional de energia mais baixa do estado electrónico fundamental (S_0). As populações de moléculas nos diferentes estados vibracionais seguem uma distribuição de Boltzmann [3]:

$$\frac{N_n}{N_0} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \quad \text{Equação I.1}$$

em que N_0 e N_n correspondem à população de moléculas no estados vibracional fundamental e n-ésimo estado vibracional excitado respectivamente, ΔE é a diferença de energia entre estados, k corresponde à constante de Boltzmann e T à temperatura.

Como consequência a probabilidade de ser excitada uma molécula no estado vibracional fundamental como resultado da absorção de luz é maior que a de excitar uma molécula que se encontre num estado vibracional excitado. A maioria das transições electrónicas que resultam da absorção de fotões ocorrem do estado fundamental vibracional de S_0 para um estado electrónico excitado final (o estado final depende do *quantum* de energia associado ao fotão). Na grande maioria das moléculas, a transição electrónica decorrente da absorção mais relevante para a fluorescência é aquela que ocorre entre S_0 e o primeiro estado electrónico excitado (S_1). Existem excepções, como o

caso do azuleno em que a emissão de luz por fluorescência se dá a partir do primeiro e segundo estados electrónicos excitados simultaneamente [3].

A transição radiativa de S_0 para S_1 segue o princípio de Franck-Condon: durante a transição electrónica os núcleos das moléculas permanecem estacionários uma vez que a transição é muito mais rápida que as vibrações nucleares. O electrão é promovido a S_1 no nível vibracional cuja função de onda mais se assemelhe àquela que possuía no estado fundamental, ou seja, em que exista maior sobreposição entre as funções de onda inicial e final. De forma geral o nível vibracional final é um nível vibracional excitado. Só após a transição electrónica há o reajuste das posições nucleares [2] [3] [5]. Na figura I.1 está ilustrada uma transição electrónica em que a energia potencial molecular é aproximada por uma função potencial de Morse (uma aproximação adequada para muitos casos).

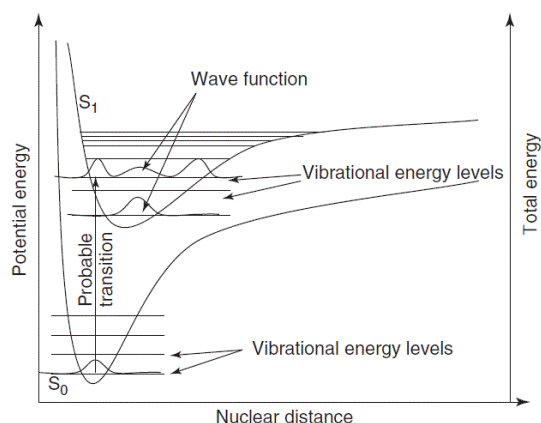


Figura I.1 – Transição electrónica mais provável. Adaptado de [5].

I.2.2.2 Relaxação electrónica e emissão de fluorescência

Uma molécula no estado S_1 tem tendência a relaxar para S_0 para que o sistema adopte uma configuração de menor energia e mais estável. A fluorescência acontece quando a relaxação de S_1 para S_0 é uma transição radiativa [3] em que os tempos de vida dos estados excitados são curtos. A de-excitação via fluorescência ocorre na ordem do nanossegundo. A relaxação para S_0 é caracterizada por um decaimento exponencial, semelhante ao decaimento radioactivo, e possui uma constante de tempo τ respeitante ao tempo de vida do estado electrónico excitado [3]. Evidentemente, num cromóforo altamente fluorescente, a relaxação por emissão espontânea de um fóton é o mecanismo dominante [5].

O diagrama de Jablonski, representado na figura I.2, permite uma fácil compreensão das transições electrónicas envolvidas nos processos de excitação e relaxação. Facilmente se percebe que a fosforescência se distingue da fluorescência por haver cruzamento intersistemas (*intersystem-crossing*) para um estado tripleto e a relaxação ocorrer a partir deste estado. Estas relaxações são muito mais lentas e por isso são caracterizadas por tempos de vida bem mais longos.

A fluorescência mais intensa ocorre a partir do estado vibracional mais baixo de S_1 . Este princípio é conhecido como regra de Kasha: como os estados vibracionais de S_1 têm energias próximas, ocorre relaxação para o estado vibracional de mais baixa energia de S_1 por conversão interna [4]. Este fenómeno de conversão interna é extremamente rápido (da ordem do femtossegundo) e precede, na maioria dos casos, a emissão de fluorescência daí a que se observe o deslocamento para o vermelho da emissão relativamente à excitação na maioria das

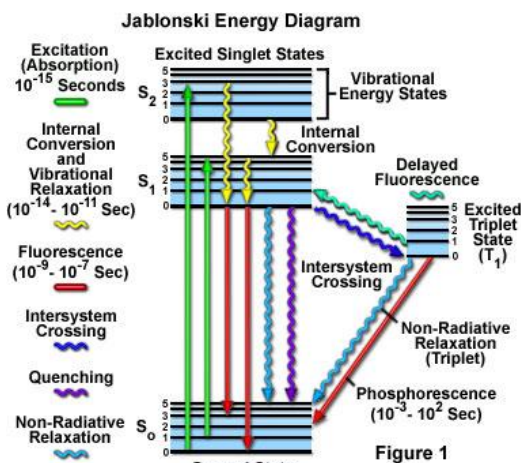


Figura I.2 – Diagrama de Jablonski: excitação e mecanismos de relaxação electrónica.

moléculas. Em espectroscopia de fluorescência este deslocamento é designado por deslocamento de Stokes. Na prática a detecção de espécies fluorescentes é mais simples quanto maior for o deslocamento de Stokes [3]. Existem compostos em o CDO de emissão coincide com o de excitação. Nestes casos a transição é electrónica pura [3].

I.3 O microscópio de fluorescência

I.3.1 Contextualização

A invenção do microscópio óptico foi um passo fundamental para a compreensão do mundo microscópico na medida em que possibilita a visualização de detalhes em estruturas que não são visíveis a olho nu. Como tal o microscópio tornou-se uma ferramenta chave em investigação clínica, ciências da vida, engenharia e noutras áreas. Graças à microscopia consegue-se estudar e compreender diversos fenómenos biológicos, bioquímicos e ambientais. A técnica de contraste de fase revolucionou a microscopia óptica por possibilitar a aquisição imagens ricas em contraste, onde é possível a visualização de estruturas translúcidas que são típicas em investigação biomédica [5]. Uma das ferramentas mais importantes em biociências é a MF sendo actualmente a técnica de microscopia de contraste mais utilizada. As imagens de MF têm propriedades únicas que outras técnicas de contraste não são capazes de exibir [5] [6].

As grandes vantagens que a MF tem sobre outras técnicas de microscopia são o excelente contraste de imagem, grande sensibilidade, especificidade e selectividade. Nesta técnica, marcadores fluorescentes são excitados por uma fonte de luz, relaxam e emitem luz no seu CDO característico. As regiões da amostra onde os marcadores estão ligados sobressaem contra um plano de fundo escuro com imenso contraste, o que possibilita a visualização de estruturas que, de outra forma não seriam perceptíveis. Ao mesmo tempo, é possível estudar a funcionalidade de biomoléculas, reacções enzimáticas, entre outras [2]. Esta é sem dúvida uma das grandes atracções desta técnica: é exequível estudar o sinal de fluorescência em função dos parâmetros do meio *in vitro* ou *in vivo* em tempo real [5]. As técnicas de MF de última geração são extremamente sensíveis e permitem monitorizar biomoléculas individuais se estas estiverem marcadas adequadamente [7].

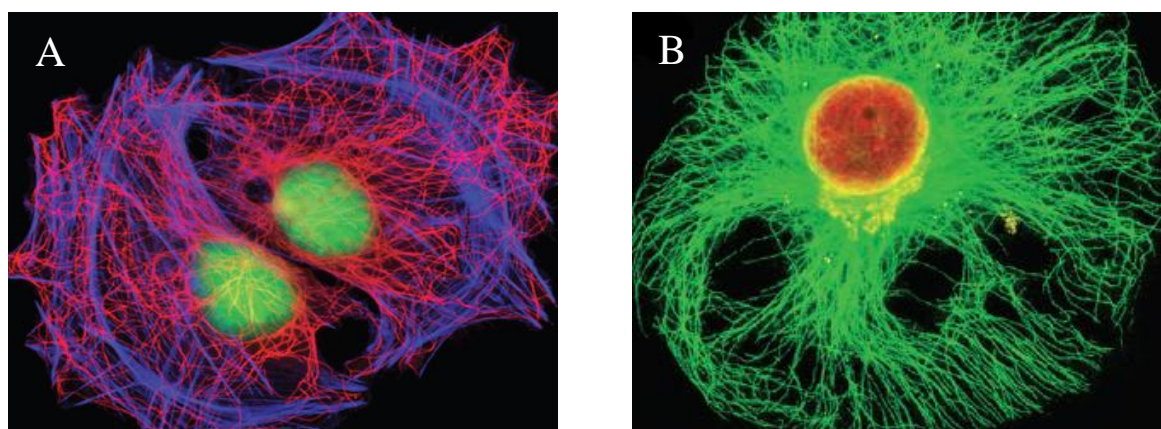


Figura I.3 – Células da aorta de ratinhos marcadas com fluoróforos orgânicos (A). Actina marcada com Alexa Fluor 350 (azul), Tubulina marcada com Alexa Fluor 568 (vermelho) e DNA marcado com SYTOX Green. Células HeLa marcadas com QDs (B). Tubulina marcada com QDot525 (verde), complexo de Golgi marcado com QDot585 (amarelo) e histonas marcadas com QDot655 (vermelho). Adaptado [2].

Os marcadores mais utilizados para obter imagens por fluorescência em MF são fluoróforos orgânicos. Estes constituem o estado da arte na marcação mas existem outros disponíveis tais como os QDs, nanopartículas de metais nobres, nanocristais de silício, entre outros [5] [6]. A figura I.3 é ilustrativa da alta especificidade na marcação celular com fluoróforos orgânicos e QDs.

I.3.2 Fundamentos de microscopia de epifluorescência

Um MF tem de ser construído de maneira a permitir a separação efectiva da luz emitida por fluorescência daquela que é emitida pela fonte. A luz emitida pela fonte é muito mais intensa que a fluorescência que é emitida pela amostra e é por isso que a separação eficaz da luz da fonte da luz de fluorescência é absolutamente necessária para a obtenção de imagens de elevado contraste [5].

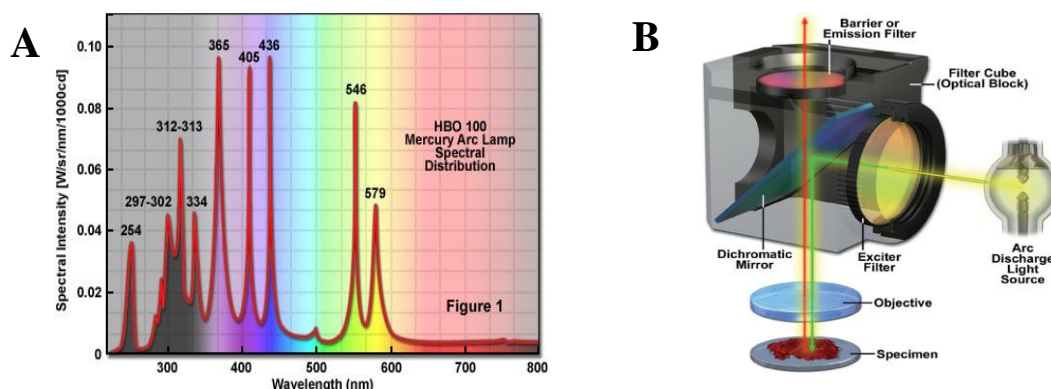


Figura I.4 – Espectro de emissão de lâmpada de mercúrio (A) e montagem do bloco óptico num microscópio de epifluorescência (B). Adaptado de [2].

Os MFs podem funcionar de acordo com o princípio de transmissão ou reflexão de luz (epi-iluminação). As imagens formadas com base na epi-iluminação implicam menor perda de luz excitatória e por isso, os MFs cujo arranjo óptico utiliza a luz reflectida são mais utilizados [2]. A fonte de iluminação pode ser uma lâmpada de mercúrio ou lâmpadas de halogéneo muito intensas [1] [5]. As lâmpadas de descarga de mercúrio emitem numa grande gama de CDOs (figura I.4 A) e como são menos dispendiosas, são mais comuns. Existem outras fontes luminosas que são adequadas para fluoróforos orgânicos específicos [2]. A epi-iluminação é conseguida graças ao arranjo do espelho dicróico e dos filtros de excitação e emissão no bloco óptico (figura I.4 B) [2]. A luz da fonte é filtrada pelo filtro de excitação para que apenas seja transmitida a banda de CDOs que vão excitar o fluoróforo. O espelho dicróico está posicionado a 45° em relação ao feixe de luz transmitida pelo filtro de excitação e reflecte o feixe na direcção da objectiva. As objectivas nos microscópios de fluorescência têm elevada abertura numérica [5]. A luz reflectida excita a amostra após passar a objectiva. Ao relaxar a amostra emite fluorescência. Os fotões emitidos atravessam a objectiva e o espelho dicróico transmite a fluorescência. O filtro de emissão, por sua vez, impede a passagem de qualquer luz excitatória residual [1] [2] [5]. A imagem de fluorescência é finalmente formada na ocular. A emissão de fluorescência é quase sempre isotrópica, por isso apenas uma pequena fracção de fluorescência chega à ocular. As imagens de epifluorescência possuem uma percentagem considerável de fluorescência de fundo pois a eficácia dos filtros e do espelho dicróico nunca é 100%. A deficiente preparação da amostra também poderá contribuir para a fluorescência de fundo. A solução passa pelo uso de um conjunto de filtros adequados que eliminem ao máximo o sinal de fluorescência de fundo [2].

I.4 Marcadores fluorescentes

Células, organelos e biomoléculas podem possuir fluorescência intrínseca (autofluorescência). Contudo, na grande maioria das estruturas de interesse em investigação clínica e biomédica essa autofluorescência é não específica e fraca e são obtidas imagens com baixo contraste. Actualmente existe uma vasta gama de marcadores fluorescentes de elevada especificidade e selectividade no mercado. Graças a estes marcadores é possível estudar estruturas e acompanhar fenómenos bioquímicos [5]. As propriedades ópticas e físico-químicas são extremamente importantes no que diz respeito à escolha do marcador ideal para imagiologia ou aplicações analíticas.

Os marcadores fluorescentes podem apresentar as mais variadas composições químicas e estruturais. Podemos agrupá-los em três categorias distintas: fluoróforos orgânicos, NPs fluorescentes e proteínas e péptidos fluorescentes.

I.4.1 Fluoróforos orgânicos

Os fluoróforos orgânicos são moléculas orgânicas geralmente constituídas por vários anéis aromáticos (ver figura I.5). A massa molecular dos fluoróforos pode divergir bastante mas, em geral, são moléculas de dimensões inferiores a 0,5nm [5]. Os fluoróforos actualmente disponíveis cobrem uma vasta gama de CDOs, desde o ultravioleta (UV) próximo ao infravermelho (IV) próximo. Podem formar ligações covalentes ou não-covalentes com o espécimen a analisar e podem ainda ser conjugados com outros marcadores (outros fluoróforos, NPs ou proteínas fluorescentes) ou com pequenas moléculas (aminoácidos, açúcares) para formar complexos altamente específicos e selectivos [8]. A formação destes complexos pode resultar numa maior estabilidade química, no aumento de intensidade de fluorescência e/ou deslocamento do CDO de emissão [4] [5] [8].

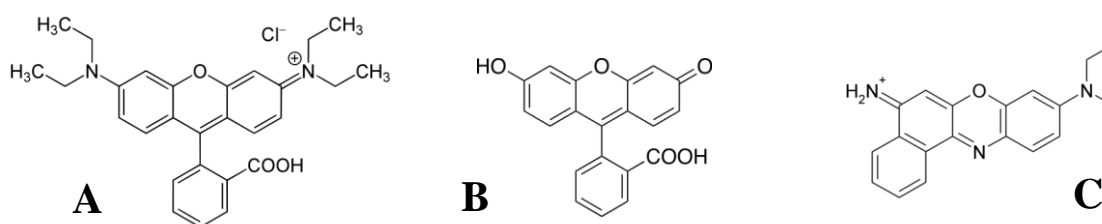


Figura I.5 – Estrutura química da rodamina B (A), fluoresceína (B) e azul do nilo (C). Estruturas desenhadas com o *software* ChemDraw.

Os fluoróforos orgânicos podem ser agrupados em famílias químicas: rodaminas, cianinas, fluoresceínas, oxazinas, esquarinas, derivados de naftaleno, antraceno, heterocíclicos azotados, sulfonados, oxigenados, etc. [8]. A possibilidade de usar mais do que um fluoróforo simultaneamente permite adquirir imagens multicoloridas. Cada fluoróforo liga-se à molécula a que tem afinidade e emite no seu CDO característico (ver figura I.3 A).

Apesar de constituírem o estado da arte em marcação fluorescente, os fluoróforos orgânicos têm algumas limitações. Destas destacam-se a sua tendência para degradação com a luz (*photobleaching*), baixa solubilidade em meio aquoso e frágil estabilidade química. O desenvolvimento de fluoróforos orgânicos de CDOs de excitação no IV próximo com rendimentos

quânticos de fluorescência (FQY) elavados é ainda um desafio. A carência de marcadores com estas características é uma lacuna bastante relevante já que estes são de extrema importância para investigação *in vivo* [8].

I.4.2 Proteínas e péptidos fluorescentes

A descoberta de proteínas fluorescentes naturais, como a *Green Fluorescent Protein* (GFP), foi um marco que impulsionou importantes progressos em MF e no desenvolvimento de técnicas de correlação analíticas que são de importância capital no estudo de processos bioquímicos intracelulares e em vários sinais biológicos complexos [2] [9]. Actualmente existe uma panóplia de proteínas fluorescentes derivadas da GFP. A síntese de proteínas derivadas da GFP é exequível graças a possibilidade de se alterar a codificação genética durante a replicação através de processos mutagénicos. Ao alterar a sua sequência de aminoácidos é possível conjugar a proteína com virtualmente qualquer biomolécula que se pretenda estudar. Isto confere a estas proteínas uma enorme versatilidade. Além disso a modificação genética permite também alterar as propriedades ópticas da proteína fluorescente, nomeadamente para manipulação dos seus CDOs máximos de absorção e emissão.

Actualmente as proteínas fluorescentes abrangem uma vasta gama do espectro visível possibilitando a obtenção de sinais multicolor fazendo uso de mais que uma proteína na marcação [9] [10]. Este tipo de proteínas pode ser expresso em praticamente todos os tipos de células [10]. Além da GFP e das suas derivadas, existem outras proteínas fluorescentes expressas na natureza, nomeadamente em organismos marinhos e respectivas proteínas derivadas da manipulação genética.

A estrutura molecular das proteínas fluorescentes é essencialmente a mesma: conformação em barril β no interior do qual existe um cromóforo fortemente fluorescente formado através de autocatálise, sem necessidade de quaisquer cofactores ou enzimas [10]. Como são moléculas biológicas, são intrinsecamente biocompatíveis.

As principais aplicações destas proteínas incluem a determinação da expressão genética, monitorização de proteínas, etiquetagem de compartimentos celulares, biossensores, monitorização de funcionalidades bioquímicas em proteínas e marcação para visualização em microscopia de super resolução [10]. No entanto as aplicações das proteínas fluorescentes estão condicionadas por algumas limitações nomeadamente ao nível da foto-estabilidade, rendimentos quânticos de fluorescência (FQY) relativamente baixos e fraca eficácia de emissão no vermelho [2].

I.4.3 Nanopartículas fluorescentes

Os avanços recentes na disciplina dos nanomateriais permitiram o *design* de nanoestruturas para uma grande variedade de aplicações. Os materiais à escala nanométrica ostentam propriedades ópticas, electrónicas, físicas e químicas completamente diferentes em relação a macroestruturas. As NPs fluorescentes são NPs puramente sintéticas, geralmente de simetria esférica, e exibem propriedades ópticas e químicas excepcionais. Na passada década foram alvo de investigação e desenvolvimento intensivo. As NPs fluorescentes podem ter estruturas bastante diversas. Os tradicionais nanocristais semi-condutores (QDs), NPs metálicas, nanocristais de silício são as NPs fluorescentes mais conhecidas e estudadas e, também, com maior número de aplicações [11]. Face

aos fluoróforos orgânicos apresentam algumas vantagens essenciais como maior foto-estabilidade, capacidade superior para congregar diferentes sinais (*multiplexing*), maior gama de absorção e maior biocompatibilidade em relação a determinados fluoróforos orgânicos [11].

Aplicações em bioimagem, nanossensores e optoelectrónica demonstraram ser bem-sucedidas mas apesar disso o potencial destas NPs permanece bastante inexplorado. Em seguida apresenta-se uma breve revisão nos principais tipos de NPs fluorescentes com excepção das CNPs, objecto de trabalho desta dissertação, cuja revisão é feita com maior detalhe no subcapítulo I.5.

I.4.3.1 Quantum Dots

Os QDs são nanocristais semi-condutores altamente fluorescentes. De forma genérica, a estrutura dos QDs compreende um núcleo metálico nanocristalino semi-conductor, geralmente de CdTe ou CdSe, revestido por uma camada semi-conductora, geralmente ZnO ou ZnS. O revestimento permite o aperfeiçoamento das propriedades ópticas e da estabilidade coloidal dos QDs. Adicionalmente o revestimento pode ser manipulado para funcionalizar a superfície das NPs com vista ao aumento da estabilidade em solução aquosa, ou para conjugação com moléculas específicas (ver figura I.3 B) [12]. Estas NPs apresentam tamanhos típicos de 1-10nm e possuem uma grande resistência ao *photobleaching* [12] [13].

A emissão de fluorescência por parte dos QDs resulta de um efeito de confinamento quântico. O efeito de confinamento quântico ocorre quando o diâmetro de um nanomaterial semi-conductor é comparável ao CDO da função de onda electrónica. Quando tal acontece o espectro de energia torna-se discreto e as diferenças de energia entre estados tornam-se dependentes do tamanho das NPs [14]. O efeito de confinamento quântico dos QDs cobre todo o espectro visível. Graças a este efeito é possível controlar o CDO de emissão através da manipulação dos parâmetros de síntese de forma a controlar o tamanho dos QDs (ver figura I.6).



Figura I.6 – Soluções de QDs à luz UV. QDs com tamanhos mais pequenos correspondem a deslocamento da emissão para o azul. Adaptado de [13].

O facto de os QDs terem bandas de emissão ajustáveis com o tamanho e de estas bandas serem bastante simétricas e estreitas, acoplado à larga banda de absorção, confere-lhes uma vantagem significativa face a outros marcadores fluorescentes. Além disso a funcionalização da superfície dota os QDs de uma maior estabilidade química face aos fluoróforos orgânicos [15]. Contudo, por conterem na sua constituição metais pesados como o Cd, a aplicação de QDs em sistemas biológicos está fortemente condicionada. Com efeito, a libertação de iões Cd^{2+} resulta na elevada citotoxicidade associada a estas NPs [11].

I.4.3.2 Nanopartículas metálicas fluorescentes

Uma alternativa viável aos QDs são as NPs metálicas fluorescentes. São constituídas por metais nobres como Au ou Ag, de baixa reactividade, e portanto não possuem o risco da toxicidade que geralmente é associada a metais pesados [11]. A síntese destas NPs passa por um passo de nucleação e por um passo de estabilização com um *scaffold* orgânico. Esta estabilização é essencial para evitar a formação de grandes agregados e garantir a sua estabilidade coloidal [16].

A fluorescência das nanopartículas metálicas é resultado da relaxação de ressonâncias plasmónicas em defeitos da superfície [5] [11].

As NPs metálicas fluorescentes exibem dimensões reduzidas e boa biocompatibilidade. Como tal podem ser usadas para marcação de tecidos biológicos e devido ao seu comportamento fotoquímico, estas NPs apresentam-se como boas candidatas para aplicações biossensoriais *in vivo* [11]. A funcionalização da superfície destas NPs promove a sua especificidade de marcação. Ainda assim subsistem alguns problemas ao nível da foto-estabilidade [5].

I.4.3.3 Nanocristais de Silício

O Silício (Si) é um material semi-conductor com banda de valência com um carácter indirecto. Este material exibe uma performance óptica fraca. As NPs de Si só foram alvo de intensa investigação quando foi descoberta a emissão de fluorescência no vermelho em silício poroso.

Os nanocristais de Si ostentam três bandas distintas de emissão: no IV, no vermelho e no azul. A existência de radicais livres na banda de valência é responsável pela emissão no IV. Quanto à emissão no vermelho e no azul é provável que a explicação resida num efeito de confinamento quântico, semelhante ao dos QDs, e na recombinação radiativa em defeitos de superfície [17].

A morfologia da superfície dos nanocristais de Si afecta fortemente a fluorescência. A fluorescência dos nanocristais de Si também é afectada pela composição molecular da superfície. Além disso estas NPs apresentam comportamentos de emissão dependente do tamanho do nanocristal. Isto suporta a teoria da existência de dois mecanismos distintos de fluorescência nos nanocristais de Si. O efeito de confinamento quântico é particularmente intenso quando as NPs são de tamanho inferior a 4nm.

Os protocolos disponíveis para síntese de NPs de Si são numerosos e podem ser *top-down* ou *bottom-up* [17]. Os procedimentos de síntese em solução permitem um bom controlo do tamanho dos nanocristais e maior facilidade em manipular a superfície dos nanocristais [18]. A funcionalização da superfície é de grande importância para garantir a estabilidade coloidal [19]. As NPs de Si têm dimensões, geralmente, inferiores a 10nm [18] [19]. A elevada biocompatibilidade que demonstram [5] permite a sua aplicação em áreas como a medicina e biologia mas também podem ser utilizadas em optoelectrónica e fotónica [19].

I.4.4 Propriedades espectroscópicas e físico-químicas

As diferentes categorias de marcadores fluorescentes exibem algumas propriedades espectroscópicas, físicas e químicas distintas. Além disso certas propriedades podem variar bastante

dentro da própria categoria. A tabela I.1 permite a comparação de algumas destas propriedades entre os marcadores fluorescentes mais comuns.

Tabela I.1 – Comparação de características entre marcadores. Adaptado de [5].

Propriedade	Fluoróforos orgânicos	<i>Quantum Dots</i>	Proteínas fluorescentes
Espectro de absorção	Bandas discretas	Contínuo (UV-Vis)	Bandas discretas
Absortividade molar ($M^{-1}cm^{-1}$)	$10^4 - 10^5$	$10^5 - 10^6$	$10^4 - 10^5$
Espectro de emissão	Assimétrico com extensão para IV	Simétrico e estreito	Assimétrico com extensão para IV
Pico de emissão	UV – IV próximo	Visível – IV próximo	Visível
<i>Stokes shift</i> (nm)	Menor que 50	Até 100	10 – 50
Rendimento quântico de fluorescência (%)	50 – 100 (visível) 5 – 25 (IV próximo)	10 – 80 (visível) 20 – 70 (IV próximo)	5 – 80 (visível)
Foto-estabilidade	++	+++++	++
Tempos de vida (ns)	1 – 10	10 – 100	1 – 10
Condicionantes	pH, polaridade	-	pH, solvente
Solubilidade em água	Dependente de grupos funcionais	Requer modificação da superfície	Sim
Dimensões (nm)	Dimensões moleculares ($R_h \approx 0,5$)	2 - 60	≈ 3
Ligação biomolecular	Conjugação química	Conjugação química	Fusão
Citotoxicidade	++/+++++	+++++	+

I.5 Nanopartículas de carbono

I.5.1 Introdução

O carbono é vulgarmente conhecido como um material negro e até há pouco tempo era inconcebível considera-lo um material luminescente e solúvel em água. No entanto, estas considerações são válidas apenas à escala macroscópica, já que à escala nano, as estruturas de carbono apresentam propriedades consideravelmente diferentes. As CNPs são uma nova classe de NPs fluorescentes descobertas por acaso aquando da purificação de nanotubos de carbono por electroforese em 2004 [20] [21].

A família dos nanocarbonos é constituída pelos fulerenos, nanotubos de carbono, nanofibras de carbono, nanodiamantes, grafeno e, mais recentemente, pelas CNPs. As CNPs têm gerado muito interesse devido às suas notáveis propriedades ópticas, excelente solubilidade aquosa, estabilidade química, baixa toxicidade e facilidade de funcionalização da superfície. Enquanto a composição de outras nanoestruturas de carbono é quase exclusivamente carbono, a composição química das CNPs é maioritariamente carbono, mas a percentagem em carbono pode variar bastante [21] [22].

O carbono é um elemento não tóxico por excelência. A resposta não tóxica do carbono aliada às interessantes propriedades ópticas e elevada solubilidade das CNPs, motivaram o estudo de diversas vias para a sua síntese. Embora as aplicações das CNPs ainda sejam reduzidas, o potencial destas NPs fluorescentes é imenso e aplicações em bioimagem, nanossensores, optoelectrónica e foto-catálise já foram demonstradas [11] [21] [22]. Neste subcapítulo é feita a revisão para CNPs que são solúveis em água e adequadas para estudo de sistemas vivos.

I.5.2 Métodos de síntese de nanopartículas de carbono

As estratégias de síntese de CNPs podem ser divididas em dois tipos: métodos *top-down* e métodos *bottom-up*. Procedimentos *top-down* são actualmente o estado da arte na produção de CNPs [23]. Os procedimentos *top-down* consistem em produzir CNPs através da quebra de estruturas de carbono de grandes dimensões [22]. Entre estes métodos destacam-se a ablação a laser [24] [25], oxidação electroquímica [26], oxidação química [27] e descarga eléctrica [20]. Com métodos *bottom-up*, as CNPs são criadas a partir de precursores com alto teor em carbono. Os procedimentos de síntese *bottom-up* consistem em carbonizações [28], métodos solvotérmicos (hidrotérmicos ou com solventes orgânicos) [29] [30], irradiação com micro-ondas [23] e síntese por ultrassons [31].

Os métodos *top-down* necessitam de condições de produção complexas e materiais dispendiosos. Por esse motivo os procedimentos *bottom-up*, mais simples e económicos, têm vindo a ser alvo de crescente interesse e têm apresentado resultados muito promissores. Os procedimentos são complementados com métodos de purificação tais como, filtração, centrifugação, diálise e electroforese [22].

Algumas CNPs produzidas por métodos *top-down* possuem fraca fluorescência e fraca estabilidade coloidal. Nestes casos há necessidade de efectuar um procedimento de passivação da superfície das NPs. A passivação pode ser feita mediante oxidação química com agentes altamente oxidantes, como ácido nítrico, para criar grupos hidroxilo, carboxilo e carbonilo à superfície, ou por fixação de polímeros orgânicos à superfície (figura I.7), como o polietilenoglicol (PEG) [21] [22]. O procedimento de passivação não só melhora a intensidade de fluorescência como, diminuindo a agregação, aumenta a estabilidade das NPs em solução [32]. Em procedimentos *bottom-up*, as CNPs não precisam de qualquer passo de passivação adicional pois o próprio processo de síntese induz a passivação da superfície com grupos funcionais [22]. No entanto o passo de passivação não é bem compreendido. A necessidade de passivação parece depender do método de síntese usado [22].

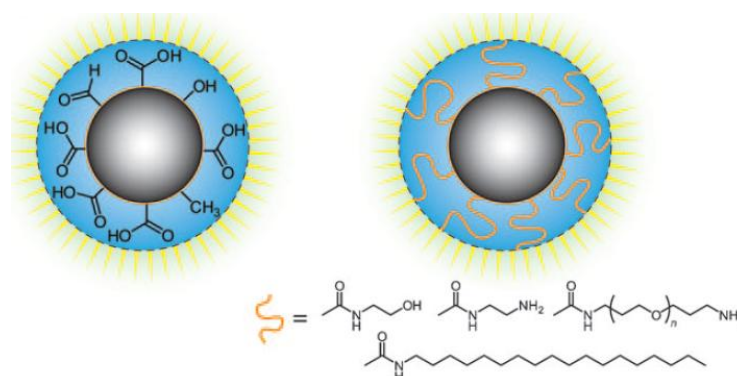


Figura I.7 – Ilustração de CNPs com superfície passivada com grupos oxigenados (esquerda) e com superfície passivada com moléculas orgânicas (direita). Adaptado de [22].

As CNPs passivadas podem ser sujeitas à funcionalização da sua superfície para as dotar de especificidade em ligação química. A funcionalização pode ser feita com pequenas moléculas orgânicas como péptidos e pequenos oligómeros ou macromoléculas como polímeros ou proteínas de forma a permitir a conjugação das CNPs com biomoléculas específicas. Genericamente os procedimentos de passivação e funcionalização das CNPs são simples e directos [33] [34].

I.5.3 Mecanismo de fluorescência das nanopartículas de carbono

O mecanismo responsável pela fluorescência das CNPs não está ainda devidamente compreendido. Como tal foram propostas algumas teorias para explicar a fluorescência destas NPs. Alguns autores propõem uma abordagem ao mecanismo de fluorescência com base em fenómenos de confinamento quântico e recombinação radiativa de excitações¹. O efeito de confinamento quântico é o mecanismo dominante na fluorescência dos QDs. A fluorescência das NPs de Si é atribuída a uma combinação de confinamento quântico e recombinação radiativa. Estas teorias aplicadas às CNPs assentam no facto das CNPs possuírem emissão dependente do tamanho [22] [35].

No entanto, os mecanismos de confinamento quântico e recombinação radiativa de excitações explicam a fluorescência em materiais semi-condutores. Nanoestruturas grafíticas tais como nanotubos de carbono curtos e CNPs sintetizados a partir de grafite são fluorescentes. O carbono grafítico é condutor eléctrico e não possui banda de valência como os semi-condutores. A luminescência de nanoestruturas grafíticas não pode ser explicada por estas teorias [33].

Alternativamente foi sugerida uma teoria em que a luminescência assenta em defeitos de superfície das NPs. A passivação com grupos funcionais à superfície suporta esta teoria uma vez que a fluorescência de CNPs cuja superfície não está devidamente passivada, como as produzidas por técnicas *top-down*, é claramente mais fraca [32]. A presença de grupos funcionais à superfície parece ser uma condição necessária para a fluorescência das CNPs já que a fluorescência é fortemente afectada pelo pH do meio. Por exemplo, a intensidade da fluorescência é condicionada pela ionização dos grupos funcionais à superfície das NPs resultante de pH extremos [33].

Adicionalmente, as CNPs formam complexos estáveis entre os grupos funcionais da superfície e iões metálicos. A formação destes complexos é evidência do duplo carácter receptor e dador de electrões das CNPs. A criação destes complexos afecta expressivamente a intensidade da fluorescência das NPs [33]. Esta dependência da fluorescência com a formação de complexos na superfície também reforça a teoria baseada em defeitos de superfície.

I.5.4 Propriedades das nanopartículas de carbono

Existem algumas características partilhadas entre as CNPs e outras NPs. Contudo, para além dessas características, as CNPs possuem outras propriedades que lhes são intrínsecas e que podem ser vantagens determinantes sobre outros marcadores. Seguidamente apresenta-se uma breve revisão das propriedades das CNPs.

¹ Um excitação é uma quasi-partícula formada pelo estado ligado entre um electrão e o poço electrónico através de interacção Coulombiana.

I.5.4.1 Propriedades físico-químicas

As CNPs apresentam uma solubilidade em meio aquoso superior à de outras NPs fluorescentes. A presença de grupos carregados na superfície das NPs passivadas controla a agregação e está na origem da solubilidade [22]. O armazenamento em solução durante um ano sem formação de precipitados é prova da excelente solubilidade das CNPs [21]. A solubilidade em meio aquoso permite a aplicação das CNPs em meio fisiológico [21] e os procedimentos de funcionalização da superfície tornam possíveis conjugações com biomoléculas. Adicionalmente a composição química na superfície das NPs é de grande importância para sua internalização através de interações com grupos carregados na membrana [36]. A solubilização das CNPs em diversos solventes orgânicos também é possível, dotando estas NPs de grande versatilidade.

As CNPs são NPs de simetria esférica ou quase esférica. Tipicamente possuem dimensões abaixo dos 10nm mas podem chegar até 100nm [22] [30]. A dimensão e forma são parâmetros particularmente importantes no que toca à internalização celular. CNPs com diâmetros mais pequenos e formas esféricas são mais facilmente internalizadas. Na literatura existem poucos estudos referentes ao controlo do tamanho e forma destas NPs com as condições experimentais apesar da importância destes parâmetros [21].

Relativamente à organização estrutural, as CNPs podem ser amorfas ou nanocristalinas. A estrutura depende do precursor usado e da forma como ficam organizadas as estruturas aromáticas e alifáticas após a síntese.

A baixa toxicidade manifestada pelas CNPs é uma das suas grandes valências. A reduzida toxicidade está relacionada com a sua fraca reactividade química [21]. Apesar de existirem poucos estudos referentes à citotoxicidade, as raras menções a decréscimos significativos na viabilidade celular são apenas referentes a concentrações de CNPs extremamente elevadas. Em caso de funcionalização da superfície das NPs a toxicidade passa a ser dependente da molécula usada [37]. A baixa citotoxicidade que as CNPs apresentam dotam estas NPs de excelente biocompatibilidade sendo por isso candidatas ideais para utilização *in vitro* e *in vivo*.

I.5.4.2 Propriedades espectroscópicas

O perfil de absorção das CNPs é particularmente intenso no UV, decaindo gradualmente à medida que se desloca para o vermelho. A absorção a maiores CDOs pode ser estendida através da funcionalização da superfície [21]. Por vezes os espectros de absorção apresentam picos no UV e ombros a CDOs mais longos. Os picos no UV são atribuídos a transições π - π^* envolvendo ligações aromáticas C=C. Ombros são originados por transições n - π^* em ligações C=O [38].

Independentemente do mecanismo de fluorescência das CNPs não estar estabelecido, existe unanimidade no reconhecimento de que os espectros de emissão de fluorescência são uma das suas características mais fascinantes. Os espectros de emissão são consideravelmente largos e assimétricos a alongar para o vermelho, contrariamente à elevada simetria e diminuta largura a meia altura (FWHM) exibida nos espectros de emissão dos QDs. No entanto as CNPs partilham com os QDs a fascinante característica de dependência da emissão com o CDO de excitação e tamanho das NPs [21] [22] [33]. A elevada FWHM do espectro de fluorescência das CNPs pode ser explicada pela heterogeneidade da superfície das NPs. A presença de estados electrónicos próximos do nível de Fermi em defeitos de superfície nas NPs pode estar na origem da dependência dos picos de

emissão com o CDO de excitação [33]. Em relação à dependência da fluorescência com o tamanho das NPs mencionada em algumas publicações não está estabelecida nenhuma teoria que explique o fenómeno. A manipulação da estrutura química na superfície permite alterar propriedades espectroscópicas das CNPs ao nível da intensidade da fluorescência e/ou do CDO de emissão [37].

O FQY é um parâmetro de especial importância em imagiologia na medida que afecta profundamente o contraste de imagem. Os FQYs das CNPs podem variar bastante. Os métodos de síntese e os precursores utilizados influenciam fortemente este parâmetro espectroscópico [21]. Na grande maioria dos casos o FQY das CNPs é inferior a 15% [37]. A passivação da superfície das CNPs, quer seja feita indirectamente no procedimento de síntese, quer seja obtida por um passo adicional, aparenta ser um requisito necessário para a obtenção de NPs fluorescentes e, portanto, está directamente relacionado com o FQY das CNPs. Relatos na literatura reportam FQYs destas NPs tão elevados quanto 78% [37].

Os tempos de vida de estados excitados apresentam curvas de decaimento multi-exponencial, característica partilhada com os QDs [11]. A existência de regiões emissivas distintas na superfície das CNPs deverá estar na origem desta natureza multi-exponencial nas curvas de decaimento [21]. Os tempos de vida médios são da ordem do nanosegundo [21] [22].

As CNPs são dotadas de grande foto-estabilidade. Tal como os QDs, são extremamente resistentes ao *photobleaching* e portanto claramente superiores aos fluoróforos orgânicos e às proteínas fluorescentes neste aspecto. Mesmo quando são sujeitas a longos períodos de irradiação, as perdas de intensidade de fluorescência são negligenciáveis [21] [30]. Além disso após longos períodos de armazenamento em solução, as CNPs mantêm as suas propriedades luminescentes inalteradas [22].

A possibilidade de *up-conversion* é uma característica óptica interessante que é atribuída às CNPs em alguns trabalhos. Resumidamente, o mecanismo de *up-conversion* consiste na excitação por dois fotões de CDO elevado, geralmente no IV próximo, e emissão de um fotão de maior energia (dobro da frequência correspondente à frequência de excitação). A importância deste mecanismo é imensa para aplicações biológicas já que os fotões de maior CDO não só penetram mais profundamente nos tecidos, como também são menos prejudiciais por implicarem menor deposição de energia nos tecidos [21]. No entanto, há alguma controvérsia acerca da veracidade da existência deste fenómeno óptico nas CNPs. Recentemente, a *up-conversion* relatada foi atribuída à difracção de segunda ordem gerada na rede de difracção do monocromador aquando da incidência de luz [38]. Apesar disso o fenómeno de *up-conversion* parece ser notório em [39]. Neste trabalho os autores estabelecem uma relação quadrática entre a intensidade de fluorescência com a intensidade de excitação. Existem poucos estudos acerca do processo de *up-conversion* em CNPs e, sem dúvida, é um fenómeno merecedor de maior atenção.

1.5.5 Aplicações das nanopartículas de carbono

Graças às extraordinárias propriedades ópticas que possuem, as CNPs são boas candidatas para aplicações em diversas áreas tais como nanossensores, optoelectrónica, imagiologia para investigação biomédica, foto-catálise, entre outras. Por serem uma descoberta recente, estudos que envolvem aplicações concretas destas NPs ainda são bastante escassos. Apresenta-se em seguida uma curta síntese de algumas aplicações bioanalíticas e de bioimagem.

I.5.5.1 Bioimagemologia

As extraordinárias propriedades ópticas e biocompatibilidade apresentadas pelas CNPs fazem destas NPs fluorescentes promissoras candidatas para estudos biológicos *in vitro* e *in vivo*. Apesar disso, estudos biológicos que fazem uso destas NPs fluorescentes ainda são reduzidos.

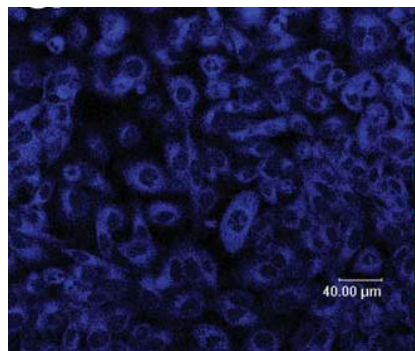


Figura I.8 – Marcação com CNPs produzidas por micro-ondas a partir de glicerol e 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamina em células HepG-2. Adaptado de [40].

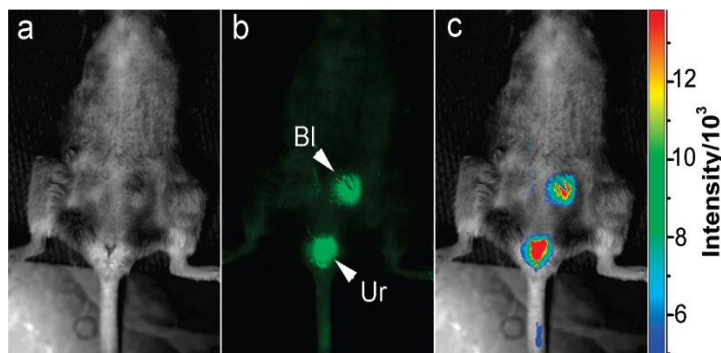


Figura I.9 – Imagem *in vivo* de fluorescência de CNPs injectadas por via intravenosa em ratinhos: a) imagem por contraste de fase; b) imagem de fluorescência; c) imagem de intensidade de fluorescência codificada por cores. Adaptado de [42].

A marcação de células com CNPs já foi demonstrada para várias linhas de células eucarióticas. A marcação com CNPs em bactérias *Escherichia coli* indicia também a possibilidade de marcação de organismos procarióticos [33]. Pensa-se que a internalização das NPs ocorra por via endocítica. Neste processo as CNPs são envolvidas por uma secção da membrana plasmática e atravessam a membrana através da vesícula formada pela secção de membrana. Desta forma são lançadas no meio intracelular. É um processo que pode ser mediado por uma proteína ou outra biomolécula de função estrutural mas que carece de maior estudo [22]. Na vasta maioria da literatura, as CNPs têm a superfície passivada e não funcionalizada, pelo que não são dotadas de especificidade bioquímica e, portanto, as CNPs concentram-se preferencialmente no citoplasma (figura I.8) [22] [33] [40]. Os testes de citotoxicidade mencionados na literatura relatam elevadas taxas de viabilidade celular mesmo a concentrações elevadas [21]. Um estudo chega mesmo a referir 84% de viabilidade celular a 6mg/ml [41].

Até à data estudos *in vivo* que utilizam CNPs para entender sistemas biológicos são muito raros. Num dos estudos mais completos é referida a aplicação das CNPs e nanocompósitos de carbono e sulfureto de zinco em ratinhos DBA/1. As NPs foram introduzidas por via subcutânea, intradérmica e intravenosa. A difusão das CNPs inseridas por injeção subcutânea no dorso foi relativamente baixa, comparativamente com a difusão de QDs, possivelmente devido à passivação da superfície com PEG_{1500N}. Os nanocompósitos de carbono e sulfureto de zinco foram inseridos por via intradérmica e migraram para os nodos axilares linfáticos e, graças à fluorescência, a sua migração foi acompanhada em tempo real. Para o estudo do sistema circulatório, foi inserida uma solução de CNPs por via intravenosa mas foram observadas apenas emissões na bexiga, onde as CNPs se acumularam e foram posteriormente expelidas (figura I.9) [42]. O estudo demonstra o enorme potencial para a utilização das CNPs como agentes de imagem para tecidos *in vivo* fazendo-se valer da enorme biocompatibilidade e forte fluorescência destas NPs.

I.5.5.2 Aplicações bioanalíticas

Aplicações de CNPs como nanossensores encontram-se numa fase muito precoce de investigação. O princípio de detecção destes nanossensores é variação da intensidade ou do CDO da fluorescência em função de alterações nos parâmetros do meio tais como variações de pH, polaridade, presença de sais inorgânicos, presença de biomoléculas, etc. Graças à excelente fluorescência, elevada afinidade e sensibilidade a moléculas orgânicas, inorgânicas e biomoléculas estas NPs demonstram grande potencial como nanossensores químicos, bioquímicos, biológicos e ambientais [43]. As tabelas I.2 e I.3 exibem os resultados de alguns estudos realizados para detecção de iões inorgânicos e moléculas biológicas ou orgânicas:

Tabela I.2 – Aplicações de CNPs em detecção de sais inorgânicos. Adaptado de [43].

Ião inorgânico	Limiar de detecção	Comportamento linear	Aplicação real
Hg ²⁺	0,23nM	0,5-10nM	Água de lago
Cu ²⁺	13nM	0,001-0,1mM	Células vivas
Fe ³⁺	0,32μM	0-20μM	Água
Ag ⁺	500pM	-	Água de lago
Pb ²⁺	5,5μM	0-6,0mM	Água de lago
Sn ²⁺	0,36μM	0-4,0mM	Água de lago
Co ²⁺	0,67nM	1,0-1000nM	Células HepG2
I ⁻	430nM	0,5-20μM	Urina
F ⁻	31nM	0,1-10μM	Pasta de dentes

Tabela I.3 – Aplicações de CNPs para detectar moléculas biológicas e orgânicas. Adaptado de [43].

Molécula	Limiar de detecção	Comportamento linear	Aplicação real
Trombina	5nM	0-120nM	-
DNA	1nM	3-80nM	-
Fosfatos	0,51pM	0,4-15nM	Águas artificiais
Nitritos	0,53pM	0,1-10nM	Leite, água
Peróxido de hidrogénio	0,4μM	1-100μM	-
Glucose	45μM	2-18mM	Soro sanguíneo humano
Ácido úrico	-	0,1-1,8mM	Urina humana
Dopamina	11,2nM	0,1-30μM	Solução para injeção
Óxido nítrico (NO)	3nM	-	Células vivas
Sulfeto de hidrogénio	10nM	-	Células vivas

A complexidade dos nanossensores varia consideravelmente conforme o objectivo da aplicação. Os nanossensores podem ser simplesmente CNPs sem qualquer modificação ou podem ser estruturas híbridas de CNPs com outros marcadores e utilizados como sensores ratiométricos [43] [44]. O princípio de funcionamento destes nanossensores pode ser meramente a inibição ou incremento da fluorescência por interacção com o alvo ou, como no caso dos sensores ratiométricos, através do princípio de transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET) alterando dramaticamente o espectro de emissão.

Capítulo II – Parte experimental

II.1 Síntese

II.1.1 Preâmbulo

No início deste trabalho começou-se por produzir CNPs usando de métodos simples mencionados na literatura com algumas optimizações ao nível dos passos de purificação. O objectivo deste primeiro passo era a validação destes métodos de produção e a familiarização com algumas técnicas de caracterização como a espectroscopia de absorção no UV-Vis, espectroscopia de fluorescência e dispersão dinâmica da luz (DLS). Cumprida esta etapa, foi decidido produzir CNPs a partir de poli(ácido acrílico) (PAA) por via hidrotérmica manipulando a temperatura e tempo de reacção, e produção de CNPs a partir da carbonização de grãos de cortiça. Contudo, logo no início da produção de CNPs com PAA, constatou-se que este apresentava o risco de alguma citotoxicidade [37]. A citotoxicidade está associada a fracções residuais de polímero que se obtêm no produto final e à possível passivação da superfície das CNPs com PAA. Como o objectivo deste trabalho é a síntese de CNPs biocompatíveis para internalização celular, abandonou-se a produção de CNPs a partir de PAA. Apostou-se então na produção de NPs a partir de cortiça. Para fazer um estudo do efeito da variável temperatura, foram previamente realizados alguns ensaios para averiguar o tempo para o qual, à temperatura mais baixa de síntese, era obtida uma carbonização homogénea em toda a amostra.

II.1.2 Reagentes usados em síntese

Os reagentes utilizados nos métodos de produção foram fornecidos pela Sigma-Aldrich, J. T. Baker e Alfa Aesar. Todos os reagentes foram usados tal como foram recebidos sem qualquer purificação adicional. Foi usada água desionizada como solvente em todas as sínteses. As cascas de laranja foram obtidas de laranjas compradas num mercado local. A cortiça em pó foi fornecida pela corticeira Amorim (ver características no apêndice B).

Tabela II.1 – Tabela dos reagentes usados em síntese.

Nome	Fórmula	Massa molar (g/ mol)	Grau de pureza (%)	Marca
Poli(ácido acrílico)	$(C_3H_4O_2)_n$	1800	-	Sigma-Aldrich
Gelatina de pele de bovino, tipo B	-	-	-	Sigma-Aldrich
Ácido cítrico monohidratado	$HOC(COOH)(CH_2COOH)_2 \cdot H_2O$	210,14	99,8	J.T. Baker
Etilenodiamina	$NH_2CH_2CH_2NH_2$	60,10	≥99	Sigma-Aldrich
Hemi-sulfato de quinino hidratado	$C_{20}H_{24}N_2O_2 \cdot H_2O \cdot 0,5 H_2SO_4$	391,47	≥98	Sigma-Aldrich
Polivinilpirrolidona	$(C_6H_9NO)_n$	55000	-	Sigma-Aldrich
Cascas de laranja	-	-	-	Mercado
Cortiça	-	-	-	Corticeira Amorim

II.1.3 Materiais usados em síntese

As sínteses hidrotérmicas foram efectuadas num reactor de politetrafluoretileno (teflon) revestido por uma câmara de aço inoxidável com capacidade para aproximadamente 150ml (figura II.1). As carbonizações foram feitas num copo de vidro pyrex ou num cadinho cerâmico de fundição.



Figura II.1 – Reactor de teflon com capacidade para cerca de 150ml (esquerda) e respectiva câmara de aço inoxidável (direita).

Os materiais usados na purificação das CNPs foram os seguintes: nas filtrações, foram usadas filtros de nylon da marca GVS, de 0,2µm com 47mm de diâmetro e/ou filtros de papel de 43-48µm com diâmetro de 125mm da Filter-Lab. Nas centrifugações, foram usados tubos de

centrífuga de 50ml de PPCO Nalgene e para a purificação por diálise usaram-se membranas de celulose MEMBRA-CEL MD-25-14 com peso molecular de corte de 3000Da.

II.1.4 Equipamentos usados em síntese

Para a sintetização de CNPs foram usadas uma mufla eléctrica Césame MI7 e uma mufla eléctrica Select-Horn da empresa J.P. SELECTA. A segunda mufla apenas foi usada para carbonizações a seco de grãos de cortiça.

Para centrifugações usaram-se duas centrífugas consoante a necessidade de velocidade de rotação. Para velocidades de rotação superiores (40000g) foi usada a centrífuga Avanti J-26 XPI da Beckman Coulter com o rotor JA 25-50. A centrífuga Sigma 3K30 da B. Braun Biotech International com rotor 12156 foi usada em centrifugações a velocidades mais baixas ($\leq 23000g$).

As nanopartículas que foram armazenadas a seco foram liofilizadas num liofilizador CRYODOS – 50 da Telstar com 8 mangueiras.

II.1.5 Procedimentos

II.1.5.1 Síntese hidrotérmica

A síntese hidrotérmica é um método usado na preparação de nanoestruturas hidrofílicas. O método de síntese utiliza como solvente a água. No processo os precursores sofrem diversas reacções a temperaturas moderadas em água comprimida. As condições de temperaturas e pressão geradas no interior do reactor permitem as interacções entre reagentes que, de outra forma, seriam muito difíceis de reproduzir. É uma técnica simples, económica e bastante versátil [45]. Todas as sínteses foram realizadas em condições de temperatura e pressão consideravelmente abaixo do ponto crítico da água (374°C a 218atm) para garantir a integridade do autoclave e também a segurança no laboratório.

Nas sínteses hidrotérmicas foram sempre usadas moléculas e polímeros solúveis em água como fonte de carbono. As CNPs mais interessantes e cujos resultados são apresentados nesta tese foram sintetizadas a partir de polivinilpirrolidona (PVP), PAA, gelatina e ácido cítrico e etilenodiamina.

Para sintetizar CNPs por via hidrotérmica, o procedimento geral era o seguinte: dissolução de uma quantidade de reagente num dado volume de água, tipicamente cerca de 30mg/ml. Transferência da solução para o reactor de teflon colocado numa câmara de aço inoxidável e a sua introdução na mufla. Programação da mufla para a temperatura e tempo de reacção estipulados. Após o tempo de reacção o reactor arrefecia à temperatura ambiente durante várias horas (geralmente uma noite). Seguidamente procedia-se à centrifugação da solução obtida e filtração com uma membrana de nylon numa placa de filtração. Depois a solução era posta a dialisar contra água desionizada durante pelo menos 24h. Procedia-se a uma segunda filtração com uma membrana de nylon após a diálise e era efectuada a secagem por liofilização durante 9h ou mais para posterior armazenamento a seco. A tabela II.2 expõe as condições para a síntese hidrotérmica.

Tabela II.2 – Condições em sínteses hidrotérmicas.

CNPs	Reagentes	Quantidades	Volume de água	Temperatura	Tempo	Centrifugação	Referência
PVP	Polivinilpirrolidona	1,994g	75ml	240°C	7h	40000g 45min	[46]
AC E	Ácido cítrico etilenodiamina	5,252g 1,675ml	50ml	250°C	5h	40000g 45min	[47]
G	Gelatina	1,656g	79ml	200°C	3h	16000rpm 30min	[48]
PAA	Poli(ácido acrílico)	2,527g	61ml	270°C	6h	40000g 45min	-

As diferentes NPs obtidas por síntese hidrotérmica serão mencionadas como CNPs PVP, CNPs AC E, CNPs G e CNPs PAA, tal como está apresentado na tabela II.2.

II.1.5.2 Carbonização simples

A carbonização é uma reacção pirolítica que consiste na transformação de material orgânico em estruturas carbonáceas. Nesta reacção o material sofre uma decomposição termoquímica na presença de atmosfera ambiente, da qual resulta um aumento da sua composição em carbono [49] e forte oxidação da superfície do material devido à presença de oxigénio durante a reacção.

Neste trabalho as CNPs sintetizadas por carbonização tiveram como materiais precursores cascas de laranja e cortiça em grão (micrométrico). A carbonização, como via de síntese de CNPs, está descrita em [28]. A síntese que validou este método usou cascas de laranja como matéria-prima e foi inspirada no procedimento descrito. Brevemente, 97,7g de cascas de laranja foram pesadas num copo de vidro pyrex e postas a carbonizar a 250°C durante 4h. Após o arrefecimento (muito rápido quando comparado com o da síntese hidrotérmica) o carbonizado foi suspenso em água desionizada. A solução obtida, de tonalidade escura, foi separada dos grandes pedaços de carbonizado através da filtração com papel de filtro. Após este passo, os procedimentos de purificação e isolamento eram análogos aos descritos em II.1.5.1 para a síntese hidrotérmica.

Na produção de CNPs a partir da carbonização de grãos de cortiça fez-se variar a temperatura de síntese para investigar o efeito que esta variável teria na estrutura química e nas propriedades ópticas e morfológicas das CNPs. Antes das sínteses foram feitas carbonizações de grãos de cortiça para determinar o tempo de reacção necessário para que fosse obtido um produto de carbonização homogéneo em todo o volume (olho nú) à temperatura de síntese mais baixa. O tempo de carbonização estabelecido foi de 24h. O procedimento genérico para a síntese destas CNPs era o seguinte: uma quantidade de cortiça era pesada e transferida para o cadinho. O cadinho era posto no forno e o tempo (24h) e temperatura de carbonização programados. Após o arrefecimento, o carbonizado era suspenso em água desionizada durante uma noite. Para separar os grãos carbonizados de micro e NPs, a mistura era filtrada com um papel de filtro. A solução obtida era centrifugada duas vezes para separação entre micro e NPs e evitar contaminação da amostra com *pellet* solto da primeira centrifugação. O sobrenadante era recolhido e filtrado com uma membrana de nylon numa placa de filtração. Não foi feita diálise por haver muito pouca membrana disponível. As soluções foram borbulhadas com azoto e mantidas sob atmosfera inerte. A tabela II.3 expõe os parâmetros mais importantes na produção destas NPs.

Tabela II.3 – Parâmetros na produção de CNPs a partir da carbonização de cortiça.

CNPs	Massa de cortiça	Temperatura	Tempo	1ª centrifugação	2ª centrifugação
300	3,035g	300°C	24h	20000g, 45 min	40000g, 15 min
260	3,031g	260°C			
220	3,069g	220°C			
180	3,008g	180°C			

As CNPs obtidas a partir das diferentes temperaturas serão mencionadas como CNPs 300, CNPs 260, CNPs 220 e CNPs 180. As NPs produzidas pela carbonização de cascas de laranja serão referidas como CNPs CL.

II.2 Caracterização

II.2.1 Espectroscopia de absorção

A espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis) é uma ferramenta de química analítica. É uma técnica amplamente utilizada para identificar ou quantificar moléculas ou estruturas supra-moleculares que absorvem na gama do UV-Vis [50]. Adicionalmente a análise do espectro de absorção UV-Vis permite inferir quanto ao sucesso do encapsulamento de fármacos, funcionalização de nanopartículas, etc.[51].

Quando a radiação na gama do UV-Vis incide na matéria, pode ser absorvida provocando transições electrónicas. Na gama de CDO em que ocorrem estas transições gera-se um perfil de absorção pois parte da radiação incidente não chega ao detector por ser absorvida. A absorção num CDO específico é quantificada pela lei de Lambert-Beer:

$$I = I_0 10^{-\epsilon l c} \quad \text{Equação II.1}$$

onde I e I_0 representam a intensidade de luz detectada e fornecida pela fonte respectivamente e ϵ , l , c representam a absorvidade molar, percurso óptico e concentração da amostra respectivamente. A absorvância relaciona-se com a lei de Lambert-Beer através da relação:

$$A = -\log_{10}\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon lc \quad \text{Equação II.2}$$

A instrumentação básica de um espectrofotômetro inclui uma fonte de luz com vasto espectro de emissão, monocromadores, célula de análise e um detector para a luz transmitida.

Os espectros de absorção foram obtidos com um espectrofotômetro Cary 100 Bio. Os espectros foram adquiridos na gama dos 200 aos 800nm, com velocidade de varrimento de 600nm/min e incremento de 1nm. Todos os espectros foram obtidos nas mesmas condições. Para os ensaios foram usadas células de fluorescência de quartzo com percurso óptico de 10mm. As concentrações das soluções foram ajustadas para 0,1 unidades de absorvância (u.a.) a 360nm. Na tabela II.4 apresentam-se as concentrações usadas para adquirir espectros de absorção UV-Vis.

Tabela II.4 – Concentrações usadas em espectroscopia de absorção e espectroscopia de fluorescência.

CNPs	PVP	AC E	PAA	G	CL	180	220	260	300
Concentração (mg/mL)	0,0995	0,0005	0,1003	0,0990	0,0009	0,0048	0,0140	0,0198	0,0096

II.2.2 Espectroscopia de fluorescência

Em espectroscopia de fluorescência, a amostra é excitada por radiação na gama do UV-Vis ou IV próximo e são analisadas as suas propriedades emissivas. Uma das características mais impressionantes desta técnica é a sua enorme sensibilidade que pode ser superior até três ordens de grandeza em relação à espectrofotometria de absorção possibilitando a detecção de apenas uma unidade molecular [50].

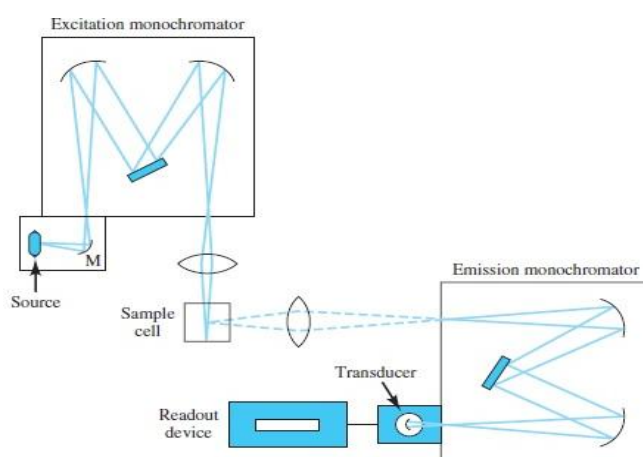


Figura II.2 – Esquema de funcionamento de um espectrofluorímetro de duplo monocromador. Adaptado de [50].

Esta técnica espectroscópica é amplamente usada em cinéticas bioquímicas, no estudo de equilíbrios químicos [52] e no estudo das propriedades fluorescentes de moléculas e materiais em geral. Com a espectroscopia de fluorescência é possível obter diferentes tipos de informação, seja

em condições de estado estacionário seja com técnicas de resolução temporal, visto os tempos de vida de estados excitados serem extremamente sensíveis a mudanças no meio.

Os sinais de fluorescência são medidos com um espectrofluorímetro. A instrumentação inclui uma fonte de luz de alta potência, lentes e monocromadores, uma câmara para a amostra e um fotodetector. O arranjo da instrumentação está ilustrado na figura II.2.

Os espectros de fluorescência e excitação foram adquiridos com um espectrofluorímetro Fluorolog-3 Spectrofluorometer da HORIBA. A aquisição dos espectros foi feita em modo *right angle* com as seguintes condições: slits de entrada com 2nm, slits de saída de 2nm, tempo de integração de 0,1s e incremento em 1nm. Foram usadas redes de difracção nos monocromadores com densidade de 1200g/mm. Estas condições foram usadas em todos os ensaios. Os espectros fluorescência de cada amostra foram obtidos com as células de fluorescência de quartzo com que foram adquiridos os espectros de absorção e com as respectivas soluções (tabela II.4).

II.2.2.1. Medição de rendimentos quânticos de fluorescência

O FQY, definido como a razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos, é geralmente determinado por comparação com uma referência de rendimento quântico conhecido. Os FQYs foram determinados de acordo com a equação referida em [53]:

$$\Phi_{am} = \Phi_{ref} \cdot \left(\frac{I_{am}}{I_{ref}} \right) \cdot \left(\frac{A_{ref}}{A_{am}} \right) \cdot \left(\frac{\eta_{am}^2}{\eta_{ref}^2} \right) \quad \text{Equação II.3}$$

Em que I , A e η representam, respectivamente, a área do espectro de emissão, a absorvância da amostra ao λ_{ex} determinado e o índice de refração do solvente. Os FQYs determinam a eficiência do processo de fluorescência relativamente a outros processos de desactivação do estado excitado, sendo um parâmetro muito importante na avaliação de uma sonda de fluorescência. Na determinação de FQYs, é vantajoso usar referências cuja emissão se assemelhe à das nossas amostras de forma a diminuir o erro de medição. Neste caso, usou-se como referência uma solução de sulfato de quinino em H_2SO_4 a 0,1M de $\Phi = 54\%$ [53] (ver procedimentos no apêndice C). É preciso ter em conta que a medição do FQY foi feita a 360nm e que a informação acerca da intensidade de fluorescência é relativa a este CDO. Alternativamente os FQY poderiam ser determinados numa esfera integradora acoplada ao espectrofluorímetro.

Por conveniência, estipulou-se que a absorção da solução de sulfato de quinino usada como padrão para medir FQYs das CNPs a 360nm fosse 0,1u.a. de forma a minimizar o erro na medição de FQYs (ver caracterização espectroscópica no apêndice C).

II.2.3 Microscopia electrónica de transmissão

A microscopia electrónica de transmissão (TEM) é uma técnica de imagem utilizada para caracterizar a morfologia de materiais a escalas para lá do alcance da microscopia óptica. As imagens TEM revelam a forma da amostra e também a sua dimensão. A elevada resolução das imagens obtidas com TEM permitem a visualização de detalhes estruturais ultrafinos e obtenção de informação estrutural à escala atómica, com resolução a poder atingir 0,1nm [1]. A alta resolução de TEM resulta do CDO dos electrões que é muito inferior à dimensão atómica. Consequentemente a

resolução é dependente da tensão de aceleração dos electrões além de outros parâmetros tais como o tipo e a espessura do material [51].

Em TEM os electrões emitidos pela fonte são focados num feixe fino por lentes electromagnéticas numa coluna em vácuo e acelerados em direcção à amostra. Apenas os electrões que são transmitidos pela amostra chegam ao detector. Os electrões que são dispersos pela amostra não chegam ao detector. Devido à dispersão, são geradas as regiões escuras correspondentes [51].

O aparelho utilizado foi um H8100 da Hitachi. Para aquisição de imagens foi aplicada uma tensão de 200kV ao filamento de Hexaboreto de Lantânio. Como suportes foram utilizadas grelhas de cobre cobertas por um filme de carbono. A montagem de cada amostra resumiu-se à secagem de uma gota de cada solução na grelha. As dimensões das CNPs nas imagens TEM foram obtidas com o *software* ImageJ.

II.2.4 Microscopia electrónica de varrimento

A microscopia electrónica de varrimento (SEM) é uma técnica de microscopia que, tal como a TEM, utiliza feixes de electrões de elevada energia para proporcionar ampliações muito maiores que as obtidas pela microscopia óptica convencional. Com SEM é possível obter resoluções até 1nm com uma grande profundidade de campo [54].

A SEM é primariamente uma ferramenta para obtenção de informação topográfica de uma amostra mas permite também a aquisição de informação acerca da cristalinidade, composição elementar e comportamento eléctrico da amostra através de diferentes modalidades de imagem [54].

O sistema óptico do SEM é constituído por uma fonte de electrões, lentes electromagnéticas para focar o feixe, bobinas de deflexão para varrimento da área seleccionada e detectores de diferentes fontes de sinal. Os electrões penetram na amostra e interagem com a matéria. O poder de penetração dos electrões depende da sua energia, da espessura da amostra e do número atómico dos elementos. Em SEM são gerados electrões secundários, retrodispersos e de Auger, bem como raios-X. São estes electrões e fotões gerados pela interacção electrónica com a matéria que fornecem vários tipos de sinais para a criação de imagens topográficas ou obtenção de informação de outros tipos. A elevada resolução espacial é conseguida à custa da focagem do feixe de electrões primário e pelo facto da energia depositada na amostra ser localizada no ponto de impacto do feixe. A detecção de electrões secundários emitidos pelo feixe primário é maioritariamente responsável pela elevada resolução espacial das imagens SEM [54].

O instrumento usado para obter imagens SEM foi um AURIGA CrossBeam (FIB-SEM) da Carl Zeiss. A preparação de cada amostra consistiu na secagem de uma gota de cada solução filtrada com um filtro de seringa de 0,45µm de acetato de celulose num pedaço de silício. Para a visualização os pedaços de silício foram montados num suporte e este inserido no respectivo lugar do equipamento. As dimensões das CNPs nas imagens SEM foram obtidas com o *software* ImageJ.

II.2.5 Dispersão dinâmica da luz

A DLS é uma técnica fiável, rápida, não destrutiva e certificada para a caracterização do tamanho de partículas em solução com aplicações em campos tão diversos como física, química,

biologia, ciências dos materiais entre outros [55]. Possui elevada sensibilidade e tem uma precisão ótima a medir tamanhos entre 0,6nm e 6µm [56]. O princípio de acção assenta na luz dispersa por partículas em movimento Browniano. As alterações de posição causam variações na intensidade de luz que é dispersa pelas partículas quando estão a ser irradiadas. A dispersão de luz por parte de partículas de dimensões inferiores ao CDO da luz é explicada pela teoria da dispersão de Rayleigh. Para partículas de tamanho semelhante ou maior que o CDO aplica-se a teoria de Mie. O sinal de DLS é uma curva de decaimento exponencial ou multi-exponencial. Para o caso mais simples, o decaimento é caracterizado por uma constante de decaimento Γ :

$$\Gamma = Dq^2 \quad \text{Equação II.4}$$

onde D e q representam o coeficiente de difusão aparente e o vector de onda dispersa respectivamente. A teoria cinética relaciona o coeficiente de difusão com o raio hidrodinâmico (R_h) das partículas através da equação de Einstein-Stokes:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad \text{Equação II.5}$$

com k_B a constante de Boltzmann, T a temperatura e η a viscosidade do solvente [56] [57]. Através desta equação, a análise da dimensão da partícula torna-se simples e imediata. A técnica de DLS não necessita do conhecimento da concentração da solução em estudo ainda que a concentração deva ser otimizada para maximização de sinal.

As medições de tamanhos por DLS foram feitas com um SZ-100 Nanopartica da Horiba. Nos ensaios utilizou-se um ângulo de dispersão a 90°. Utilizaram-se células descartáveis de plástico. Na maioria das amostras não foi possível obter sinal. Naquelas em que foi possível, fizeram-se cinco ensaios para várias concentrações. A medição de tamanhos por DLS requer a filtração da amostra. Para tal usaram-se filtros de polietileno de 0,45µm.

II.2.6 Difracção por raios-X

A técnica de difracção por raios-X (DRX) é uma das ferramentas mais importantes para a caracterização da matéria. Trata-se de uma ferramenta não invasiva de análise estrutural com aplicações na mineralogia, engenharia, ciências farmacêuticas, etc. O conhecimento do modo como os átomos se organizam em diferentes estruturas é fundamental para a compreensão das propriedades do material e da própria estrutura macroscópica. Neste contexto, cada difractograma actua como impressão digital única de cada material.

O fenómeno de difracção atende à lei de Bragg:

$$2d \sin \theta = n\lambda \quad \text{Equação II.6}$$

em que d é a distância interplanar atómica, θ o ângulo incidente, λ o CDO da onda incidente e n um escalar inteiro correspondente à ordem de difracção.

Numa experiência de difracção o CDO da onda incidente tem de ter a mesma ordem de grandeza do espaçamento entre os átomos. A amostra é irradiada com raios-X e um detector móvel

vai adquirindo as intensidades das ondas difractadas pelo material a ângulos sucessivos. As ondas difractadas que interferem constructivamente geram o padrão de difracção [58].

Os difractogramas foram adquiridos com um difractómetro X'Pert PRO MPD da PANalytical equipado com um detector 1D X'Celerator. A preparação das amostras liofilizadas para obter os difractogramas consistia na colocação de um pedaço de liofilizado num suporte de silício. No caso das amostras em solução foi necessário secar uma pequena alíquota (cerca de 1ml) no suporte de silício.

II.2.7 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Uma das técnicas analíticas mais usadas actualmente na caracterização de materiais é a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Esta ferramenta facultava informação acerca da estrutura molecular do material [59]. Os materiais absorvem no IV, o que resulta em estiramentos vibracionais e deformações moleculares a frequências características [51].

Num ensaio de FTIR a fonte de luz emite numa gama larga de CDOs. A luz incide num interferómetro de Michelson. O feixe é separado no interferómetro devido a fenómenos de interferência causados pelo interferómetro. Cada feixe possui uma modulação de sinal diferente o que resulta em diferentes padrões de interferência. Estes feixes incidem na amostra e um detector recebe a fracção de luz transmitida. O sinal resultante é relativo a cada padrão de interferência e processado através da transformada de Fourier [1].

Os espectros de FTIR foram obtidos com um espectrómetro Thermo Nicolet 6700. Os dados foram adquiridos em modo de reflectância total atenuada (ATR) em que a amostra no estado sólido se encontra em contacto com um cristal de diamante. Os espectros foram obtidos numa gama de NDOs de 650 a 4000cm⁻¹, com resolução de 4cm⁻¹.

II.2.8 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão (¹H-RMN) é uma técnica não destrutiva usada para elucidar estruturas moleculares e processos dinâmicos em diversos tipos de reacções. Esta técnica faz uso dos momentos magnéticos intrínsecos dos átomos de hidrogénio (ou outros) mediante a aplicação de um forte campo magnético externo. Os níveis de energia associados ao *spin* nuclear são separados e através da absorção de radiofrequências podem ocorrer transições entre estes estados de *spin*. Estas transições são comparadas com um modelo standardizado e traduzidas em desvio químicos relativos ao modelo. Os desvios químicos obtidos no espectro contêm informação acerca da localização dos vários protões nas estruturas dos compostos presentes na amostra [51].

Foram obtidos espectros para as amostras de CNPs obtidas a partir da carbonização da cortiça. Foi usado um espectrómetro de ressonância magnética nuclear AVANCE III da Bruker de 400MHz com uma sonda QNP de 5mm. Para preparar as amostras liofilizou-se 5ml de cada solução e re-suspendeu-se o produto seco em 700µl de água deuterada. As soluções foram inseridas em tubos de ressonância magnética nuclear e selados com tampa de polietileno.

II.2.9 Potencial Zeta

A medição do potencial ζ de uma dispersão fornece informação acerca da sua estabilidade coloidal. As partículas coloidais possuem geralmente uma carga de superfície não nula. Esta carga afecta a distribuição iónica da solução na vizinhança das partículas e é gerada uma camada. A camada interna é composta por iões fortemente adsorvidos à partícula e na camada externa a temperatura e o balanço electrostático determinam a distribuição iónica. O potencial electrocinético de partículas em suspensão coloidal, ou potencial ζ , é o potencial eléctrico medido na camada externa numa fronteira designada por *slipping plane* (figura II.3) relativa ao solvente [51].

O potencial ζ é medido mediante a aplicação de um campo eléctrico que provoca o deslocamento das partículas:

$$\mu_E = \frac{v}{E} \quad \text{Equação II.7}$$

em que v , μ_E e E correspondem à velocidade de deslocamento, mobilidade electroforética e campo eléctrico aplicado respectivamente. Da equação II.6 o potencial ζ é calculado pela equação de Henry

$$\zeta = \frac{3\eta\mu E}{2\epsilon f(Ka)} \quad \text{Equação II.8}$$

onde η , ϵ e $f(Ka)$ correspondem à viscosidade, constante dieléctrica e função de Henry respectivamente [60].

Em termos experimentais, o potencial ζ pode ser medido por microelectroforese ou electroforese por dispersão de luz. Esta segunda técnica é baseada no princípio da DLS. Genericamente as medições de potencial ζ superiores em módulo a 25mV indicam estabilidade da suspensão pois as cargas superficiais entre partículas causam repulsão electrostática. Potenciais ζ inferiores a este valor apontam para instabilidade coloidal da dispersão com tendência a precipitação, aglomeração e floculação. À medida que o potencial ζ se aproxima do potencial neutro (0mV) maior é a instabilidade [51]. O potencial ζ é sensível a factores como pH, polaridade e concentração da dispersão pois estes parâmetros alteram a distribuição iónica em solução.

Foram feitas medições de potencial ζ para amostras de CNPs 300, usando um SZ-100 Nanopartica da Horiba. Nos ensaios usou-se um ângulo de dispersão de 173°. Utilizaram-se células com eléctrodos de grafite. Tal como na medição de tamanhos, a amostra foi previamente filtrada com um filtro de polietileno de 0,45 μ m.

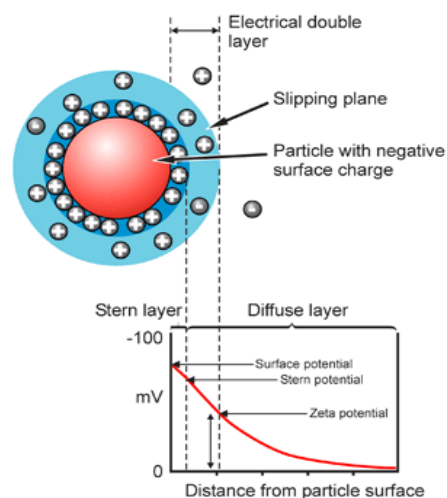


Figura II.3— Esquema da distribuição de cargas devido a uma partícula carregada. Adaptado de [51].

II.3 Culturas celulares e imagiologia celular

II.3.1 Reagentes

Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium sem vermelho de fenol da Gibco, meio de cultura McCoy's 5A (modified), tripsina comercial TrypLE Express sem vermelho de fenol, Azul tripano a 0,4% da Gibco Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) e Paraformaldeído (PFA) da Panreac.

II.3.2 Materiais

Linhas celulares HFFF2 e Saos-2, microtubos, frascos de cultura T25 SARSTEDT, placas de cultura com 24 poços SARSTEDT, tubos de 15ml e de 50ml SARSTEDT, hemocitómetro, lâminas e lamelas.

II.3.3 Equipamentos

Banho termostático WNB 10 da Memmert, Centrífuga Centurion Scientific K3 Series, incubadora MCO 19-AIC (UV) da Sanyo, câmara Labculture da ESCO, microscópio invertido de contraste de fase Nikon Eclipse Ti-S com componentes extra de epifluorescência e máquina fotográfica Nikon D610.

II.3.4 Culturas celulares e marcação

Neste trabalho cultivaram-se linhas celulares Saos-2 (osteoblastos) e HFFF2 (fibroblastos humanos) para a internalização de CNPs *in vitro*. Os procedimentos para a cultura de ambas as linhas foram análogos. Resumindo, o procedimento para a cultura celular iniciava-se com o descongelamento das linhas celulares, incubação destas num T25 para proliferação e sementeira numa placa de 24 poços com lamelas de vidro inseridas no fundo de cada poço. Os protocolos utilizados para as culturas celulares encontram-se descritos pormenorizadamente no apêndice D.

Após a adesão das células às lamelas, era efectuada a marcação das células com CNPs. Resumidamente, trocava-se o meio por outro onde estivessem CNPs dispersas. No caso das NPs armazenadas a seco, estas eram dispersas em meio de cultura e as células, após aderirem à lamela, incubavam em soluções de meio e CNPs com concentrações de 0,5 e 1mg/ml. Quanto às CNPs armazenadas em solução foram usadas alíquotas de 150 e 300µl. Depois da adesão das células à lamela, removia-se uma alíquota de meio equivalente àquela a adicionar. A alíquota de CNPs era adicionada seguidamente e as células deixadas a incubar nesta solução.

Os tempos de incubação com NPs variaram com o tipo de linhas celulares usadas. Para as linhas Saos-2 os tempos de incubação rondaram as 6h. As células HFFF2 incubaram em períodos de 6h, 10h, 24h e 72h.

II.3.5 Visualização no microscópio de fluorescência

Para a visualização de cada amostra, o meio do respectivo poço era removido com uma micropipeta e as células lavadas com 1ml de PBS duas vezes. A cada poço foi adicionado 1ml de solução de PFA a 3,7% para fixação das células. As células foram mantidas durante 10 minutos nesta solução e seguidamente as soluções de PFA nos poços eram trocadas por 1ml de PBS. A lamela era retirada do poço com uma pinça esterilizada e montada numa lâmina com a face onde estavam aderidas as células voltada para a lâmina. Se fosse necessário adicionava-se uma gotinha de PBS à lamela para evitar a secagem durante a visualização. A lâmina era montada no suporte do microscópio e a amostra observada. As células marcadas foram fotografadas com a máquina fotográfica acoplada ao microscópio.

Capítulo III – Resultados e discussão

III.1 Sínteses

III.1.1 Síntese hidrotérmica

A síntese de CNPs por via hidrotérmica foi feita sem aditivos (NaOH ou outros iões inorgânicos) e demonstrou ser um processo bastante simples e directo na produção de NPs. As reacções que ocorrem no interior do reactor não são controláveis pelo que não são conhecidos os fenómenos que ocorrem ao certo. Provavelmente, partindo de macromoléculas, devem predominar reacções de desidrogenação e hidrólise onde são quebradas ligações. Partindo de moléculas orgânicas mais simples também podem ocorrer reacções de desidrogenação mas em menor escala que em macromoléculas. Seguidamente dar-se-ão reacções de polimerização e condensação de que resultam estruturas poliméricas. Finalmente com o aumento de temperatura dar-se-ão reacções de carbonização e aromatização e ocorre nucleação destas estruturas carbonáceas [47] [61] [62]. Em todos os casos foram obtidas CNPs hidrofílicas. A tabela III.1 apresenta os resultados experimentais destas sínteses.

Tabela III.1 – Resultados de reacções hidrotérmicas.

Amostra	Quantidade de reagente	Aspecto da solução	Isolamento	Dispersão em água após isolamento	Quantidade de produto	η
CNPs PVP	1,994g	Amarela	Liofilizado	Muito boa	1,294g	65%
CNPs AC E	5,252g 1,675ml ²	Preta	Liofilizado	Muito boa	0,075g	1,1%
CNPs PAA	2,527g	Amarela clara	Liofilizado	Muito boa	0,615g	24%
CNPs G	1,656g	Amarela escura	Liofilizado	Muito boa	0,531g	32%

As soluções foram verificadas à luz UV (366nm) antes do isolamento e todas exibiam fluorescência azulada. As CNPs são bastante solúveis em água e a sua dispersão em meio aquoso é imediata. Os rendimentos de reacção para as sínteses hidrotérmicas variaram bastante. O rendimento para produção de CNPs AC E é, de longe, o mais baixo com apenas 1,1%. Este rendimento foi afectado pela perda de algum material fluorescente, provavelmente CNPs de massa inferior a 3000Da, durante a diálise. Sínteses com macromoléculas demonstraram ter maior rendimento. No entanto os rendimentos apresentados são aparentes. Os produtos finais das reacções, especialmente aqueles obtidos de macromoléculas, continham uma percentagem considerável de polímero não carbonizado como se verificará adiante.

² A densidade da etilenodiamina é $\rho = 0,899\text{g/cm}^3$. A massa de etilenodiamina usada é 1,506g.

III.1.2 Carbonização simples

As carbonizações foram efectuadas em atmosfera ambiente. As cascas de laranja usadas para produção de CNPs CL ficaram completamente carbonizadas. Houve grande perda de massa devido à evaporação da água (que é responsável por cerca de 70% da massa das cascas). As cascas carbonizadas absorveram alguma água quando foram suspensas. A quase totalidade da restante massa foi perdida na filtração com papel. O rendimento desta reacção é baixíssimo (0,027%).

Na carbonização de grãos de cortiça foi observou-se diferentes graus de carbonização respectivos a cada temperatura de síntese (figura III.1). Além disso também era evidente que, de carbonizações a temperaturas diferentes resultavam quantidades de carbonizados diferentes:

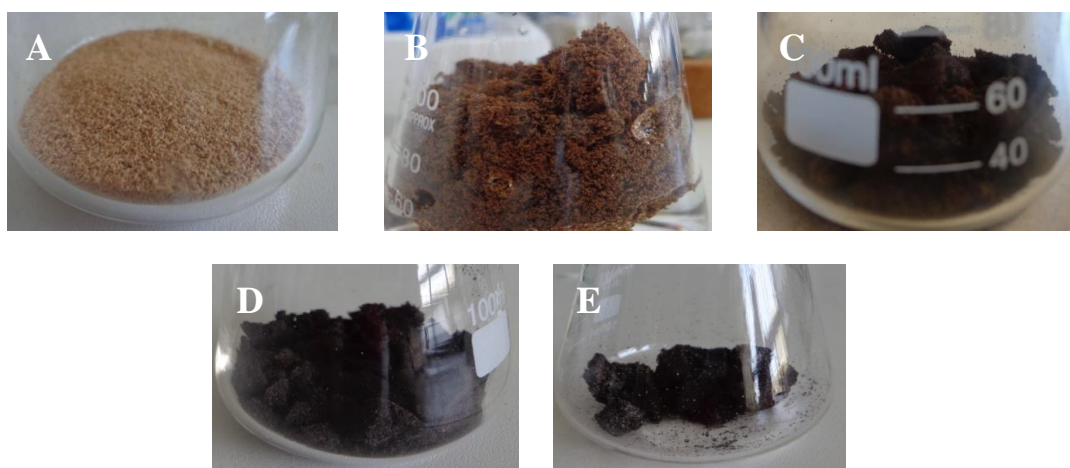


Figura III.1 – Cortiça em pó (A), carbonizada: a 180°C (B), 220°C (C), 260°C (D) e 300°C (E).

Tal como na síntese de CNPs feita com cascas de laranja notou-se alguma absorção de água pelo carbonizado e também se perdeu a maior parte da massa na filtração.

Devido à presença de oxigénio durante as carbonizações, ocorrem oxidações nas superfícies das estruturas e pequenas partículas com superfície oxidada separaram-se da macroestrutura e, por serem hidrofílicas, ficam em dispersão. A purificação elimina as partículas de maiores dimensões.

Tabela III.2 – Resultados das carbonizações. ^(a) Calculado com base na massa medida depois da secagem de uma alíquota de 5ml.

Amostra	Quantidade de precursor	Aspecto da solução	Isolamento	Dispersão em água após isolamento	Volume final	Quantidade de produto	η
CNPs CL	97,705g	Castanho Alaranjada	Liofilização	Medíocre	-	0,0259g	0,027%
CNPs 300	3,035g	Amarela	Solução em atmosfera inerte	-	64ml	0,0307g ^(a)	1,0%
CNPs 260	3,031g	Amarelo ténue	Solução em atmosfera inerte	-	62ml	0,0245g ^(a)	0,81%
CNPs 220	3,069g	Amarelo ténue	Solução em atmosfera inerte	-	65ml	0,0182g ^(a)	0,60%
CNPs 180	3,008g	Amarela	Solução em atmosfera inerte	-	64ml	0,0307g ^(a)	1,0%

Tal como nos produtos resultantes das sínteses hidrotérmicas, à luz UV (366nm) todas as soluções exibiam fluorescência azulada. Como está bem patente na tabela III.2, os rendimentos de reacção são muito baixos. No entanto, rendimentos baixos não são preocupantes visto que o material usado é biomassa que existe em abundância. A massa de CNPs obtidas a partir da carbonização da cortiça foi estimada a partir da massa medida após a liofilização de uma alíquota de 5ml de cada solução. Nos produtos finais, também foram obtidos restos de polímero (figuras III.31 e III.32). Os rendimentos das reacções também são aparentes. Este facto não surpreende. Afinal, a estrutura dos materiais precursores é fundamentalmente constituída por polímeros.

As CNPs obtidas com a carbonização da cortiça foram armazenadas em solução sob atmosfera inerte para prolongar o seu tempo de vida (*shelf life*). Optou-se por este procedimento porque nos ensaios preliminares, apesar de as soluções obtidas serem relativamente estáveis, era notória uma ligeira floculação e precipitação ao fim alguns dias. Ao borbulhar a solução com um gás inerte, neste caso azoto, remove-se oxigénio e dióxido de carbono em solução e ao manter uma atmosfera de azoto sobre a solução (num balão selado), evita-se a redissolução destes gases. Esta estratégia de preservação parece ter sido bem-sucedida na medida em que todas as soluções, com excepção da CNPs 180, mostraram boa estabilidade coloidal, com pouca ou nenhuma precipitação e floculação visível após mês e meio de armazenamento. Este procedimento é bastante usual em síntese química quando se trabalha com compostos sensíveis a oxigénio ou outro gás dissolvido em solução, mas não foi encontrada na literatura nenhuma menção à sua utilização para manter estáveis suspensões coloidais de CNPs. As concentrações das soluções das CNPs foram estimadas a partir das massas obtidas pela liofilização de alíquotas de 5ml e estão exibidas na tabela III.3.

Tabela III.3 – Concentrações aparentes das soluções de CNPs obtidas por carbonização de cortiça.

Amostra	CNPs 300	CNPs 260	CNPs 220	CNPs180
Concentração (mg/ml)	0,48	0,39	0,28	0,48

O isolamento da solução de CNPs CL por liofilização não resultou. Verificou-se alguma dificuldade em re-dispersar o liofilizado em solução. Efectivamente, só era possível uma boa dispersão recorrendo à sonicação. Além disso, a tendência para a precipitação em solução era notória. Antes do isolamento a dispersão em solução aparentava ser bastante estável e o armazenamento deveria ter sido feito em solução. Se fosse necessário proceder-se-ia ao armazenamento sob atmosfera inerte, como foi feito para as CNPs de cortiça carbonizada.

III.2 Caracterização

A caracterização das CNPs foi dividida em caracterização espectroscópica, morfológica e de estrutura química. Na tabela III.4 estão exibidas todas as técnicas utilizadas na caracterização.

Tabela III.4 – Técnicas de caracterização utilizadas (FS=Espectroscopia de fluorescência; S=Sim; N = Não; S.S. = Sem Sinal).

Amostra	UV-Vis	FS	DLS	SEM	TEM	FTIR	DRX	RMN	Pot. ζ
CNPs PVP	S	S	S	S	S	S	S	N	S.S.
CNPs AC E	S	S	S.S.	S	S.S.	S	S	N	S.S.
CNPs PAA	S	S	S.S.	S.S.	S.S.	S	S	N	S.S.
CNPs G	S	S	S.S.	S	S	S	S	N	S.S.
CNPs CL	S	S	S	S	S.S.	S	S	N	S.S.
CNPs 300	S	S	S	S	S	S	S	S.S.	S
CNPs 260	S	S	S.S.	S.S.	S	S	S	S	S.S.
CNPs 220	S	S	S.S.	S	S.S.	S.S.	S	S	S.S.
CNPs 180	S	S	S.S.	S	S.S.	S	S	S	S.S.

III.2.1 Caracterização espectroscópica

III.2.1.1 Espectroscopia de absorção no ultravioleta e visível

A caracterização espectroscópica de todas as amostras foi iniciada com espectroscopia de absorção no UV-Vis. A concentração das amostras foi ajustada de modo a que absorvância a 360nm fosse aproximadamente 0,1u.a.. Este valor de absorvância minimiza fenômenos de reabsorção em espectroscopia de fluorescência. Os espectros de absorção foram adquiridos dos 200 aos 800nm mas as absorvâncias relevantes encontram-se na gama dos 300 aos 500nm que é a gama em que foi feita a excitação das amostras para adquirir os espectros de fluorescência. Apresentam-se em seguida os espectros de absorção para cada amostra com *inset* das soluções dos respectivos CNPs à luz ambiente (esquerda) e à lâmpada UV de 366nm (direita). Todas as soluções se apresentam incolores ou ligeiramente amareladas a esta diluição e emitem luz azul.

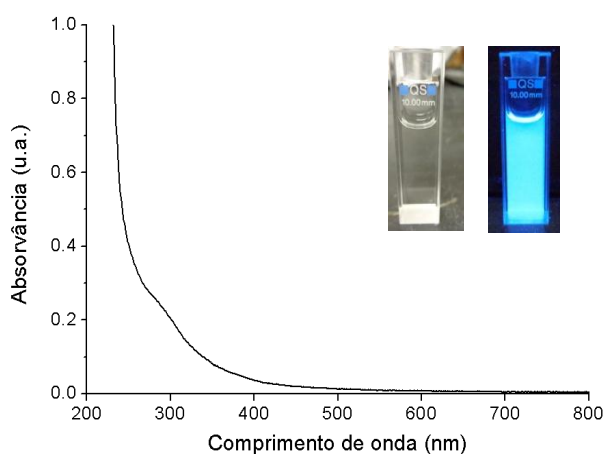


Figura III.2 – Espectro de absorção de CNPs PVP.

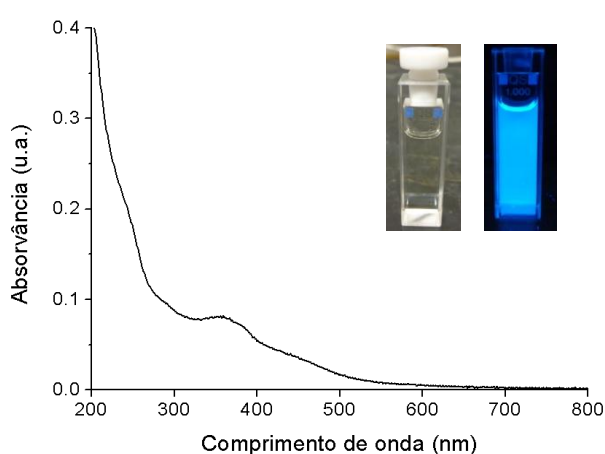


Figura III.3 – Espectro de absorção de CNPs AC E.

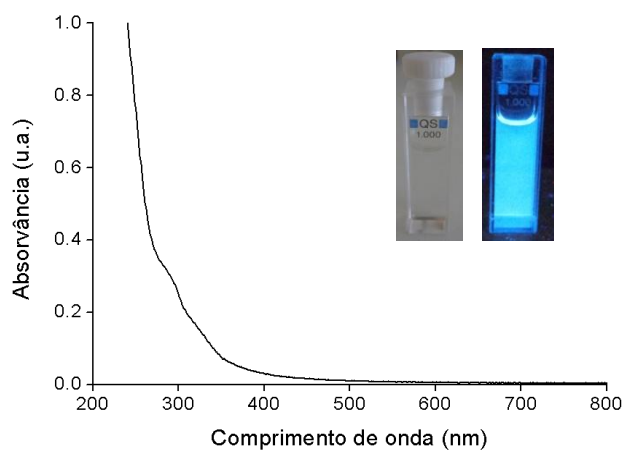


Figura III.4 – Espectro de absorção de CNPs PAA.

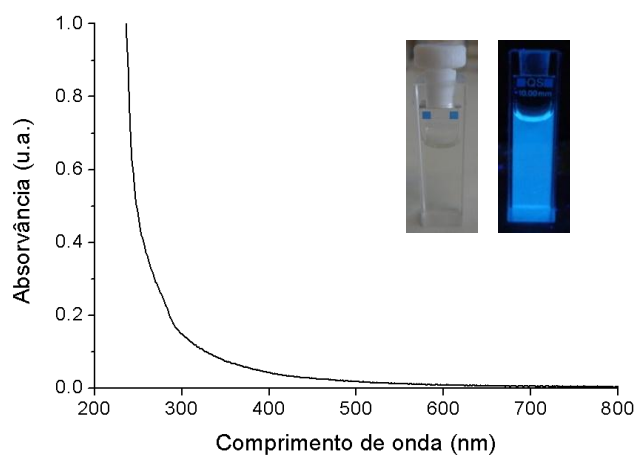


Figura III.5 – Espectro de absorção de CNPs G.

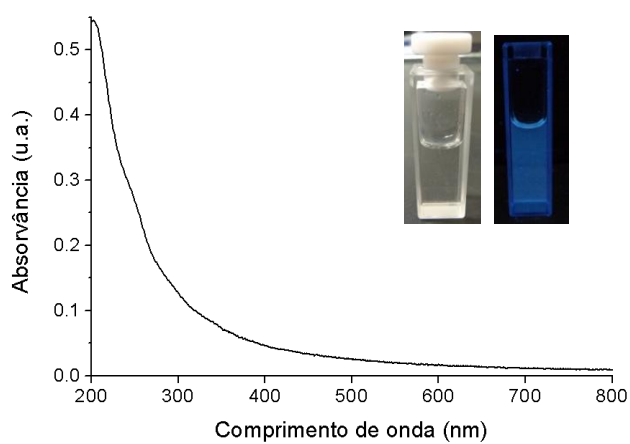


Figura III.6 – Espectro de absorção de CNPs CL.

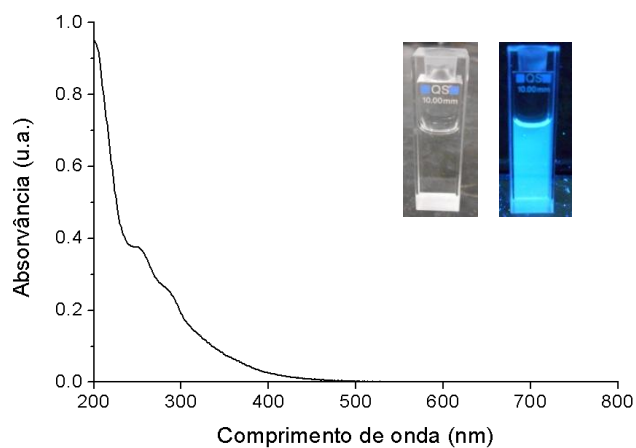


Figura III.7 – Espectros de absorção de CNPs 180.

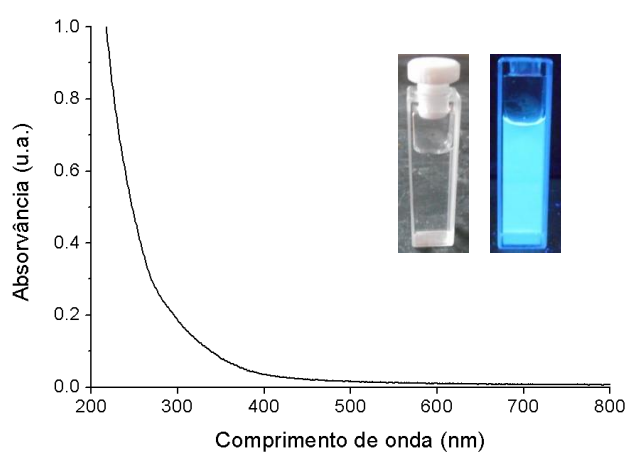


Figura III.8 – Espectro de absorção de CNPs 220.

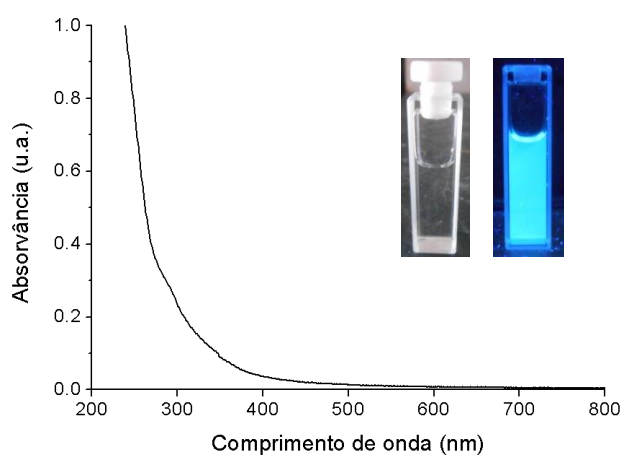


Figura III.9 – Espectro de absorção de CNPs 260.

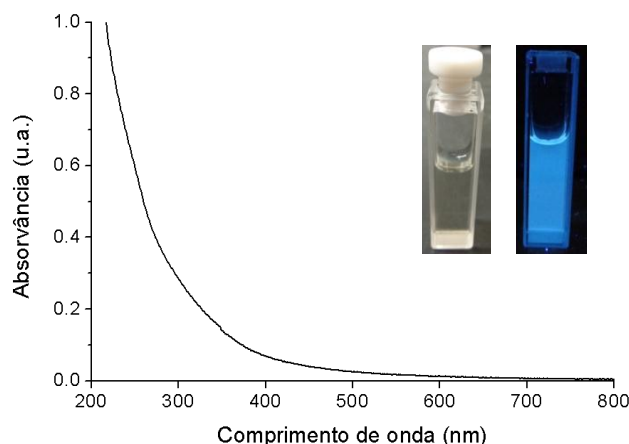


Figura III.10 – Espectro de absorção de CNPs 300.

Os espectros de absorção (figuras III.2-10) demonstram que as CNPs absorvem intensamente no UV e que a absorção decai à medida que o CDO aumenta. O espectro de absorção das CNPs AC E (figura III.3) apresenta uma banda distinta centrada a 356nm associada a uma transição electrónica. São visíveis também dois ombros nas CNPs 180 abaixo dos 300nm (figura III.7). Nos outros espectros de absorção não são detectáveis regiões de absorção específicas. Com efeito, os restantes espectros apresentam perfis de absorção semelhantes a curvas de decaimento exponencial onde nalguns são visíveis ligeiras deformações a cerca de 300nm.

Os perfis de absorção registados estão de acordo com o que está mencionado na literatura em relação à espectroscopia de absorção no UV-Vis. Quanto à atribuição das transições electrónicas é preciso ter em conta que, devido à heterogeneidade da estrutura química destes nanomateriais, é muito difícil atribuir as transições electrónicas associadas a ombros e bandas com exactidão. Por este motivo as transições electrónicas não são identificadas. No entanto, sabe-se que as transições podem ser de natureza $n-\pi^*$ ou $\pi-\pi^*$.

III.2.1.2 Espectroscopia de fluorescência

Nos ensaios de espectroscopia de fluorescência foram usadas as mesmas soluções com que foram obtidos os espectros de absorção (tabela II.4). Como já foi referido, as concentrações foram determinadas de forma a minimizar fenómenos de reabsorção. Estes fenómenos podem afectar as medições em espectroscopia de fluorescência na medida em que a amostra não só absorve a luz excitatória, como também absorve parcialmente a fluorescência que emite.

Para obter espectros de emissão com um espectrofluorímetro, o monocromador da excitação é fixo enquanto o monocromador de emissão faz o varrimento da luz emitida por fluorescência vinda da amostra na célula. Isto requer normalmente uma geometria de 90°.

Os espectros de fluorescência foram adquiridos com CDOs de excitação a partir dos 300nm, incrementando 10nm a cada nova aquisição. Para melhor percepção apresentam-se espectros obtidos varrendo os CDOs de excitação de 20 em 20nm. Para evidenciar o deslocamento para o vermelho com o aumento do CDO de excitação, são exibidos os espectros de fluorescência e os respectivos espectros de fluorescência normalizados para cada amostra.

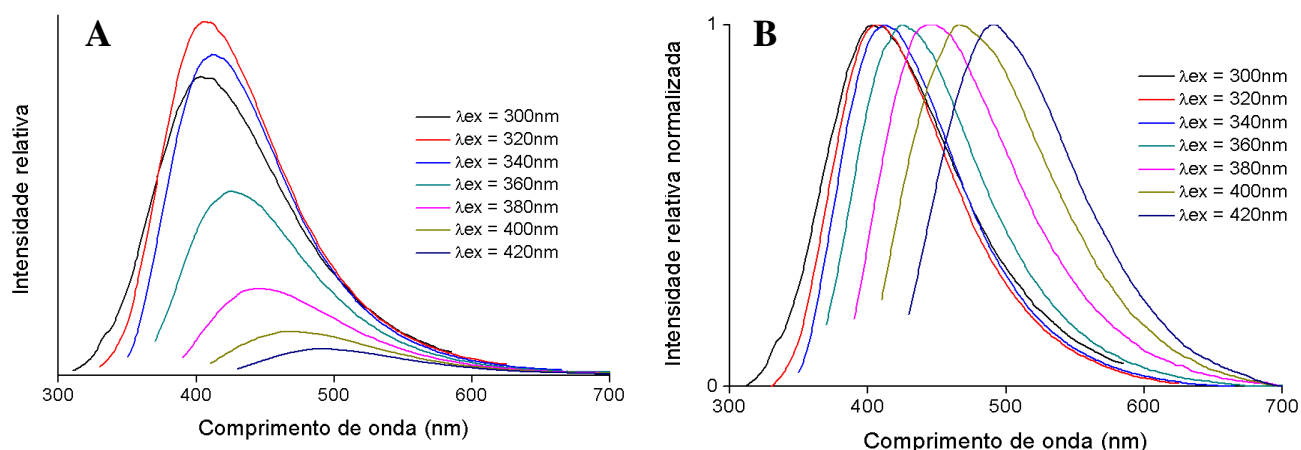


Figura III.11 Espectros de fluorescência de CNPs PVP (A) e respectivos espectros normalizados (B).

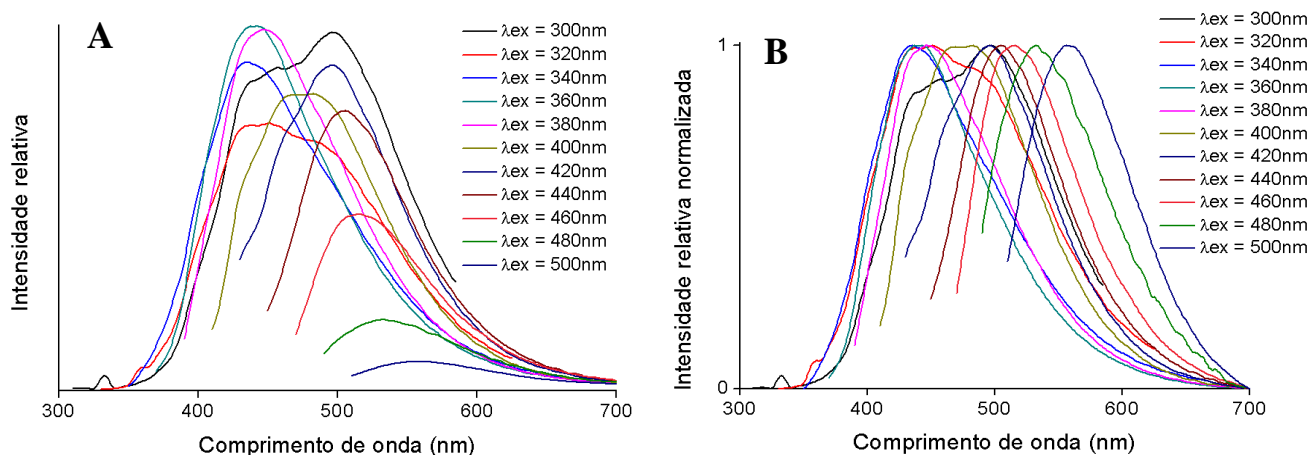


Figura III.12 – Espectros de fluorescência de CNPs AC E (A) e respectivos espectros normalizados (B).

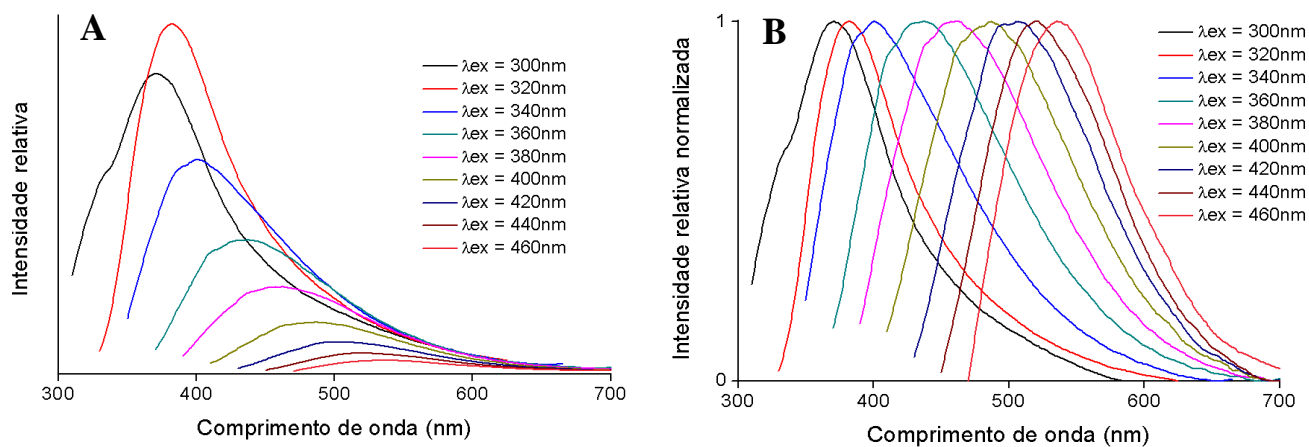


Figura III.13 – Espectros de fluorescência de CNPs PAA (A) e respectivos espectros normalizados (B).

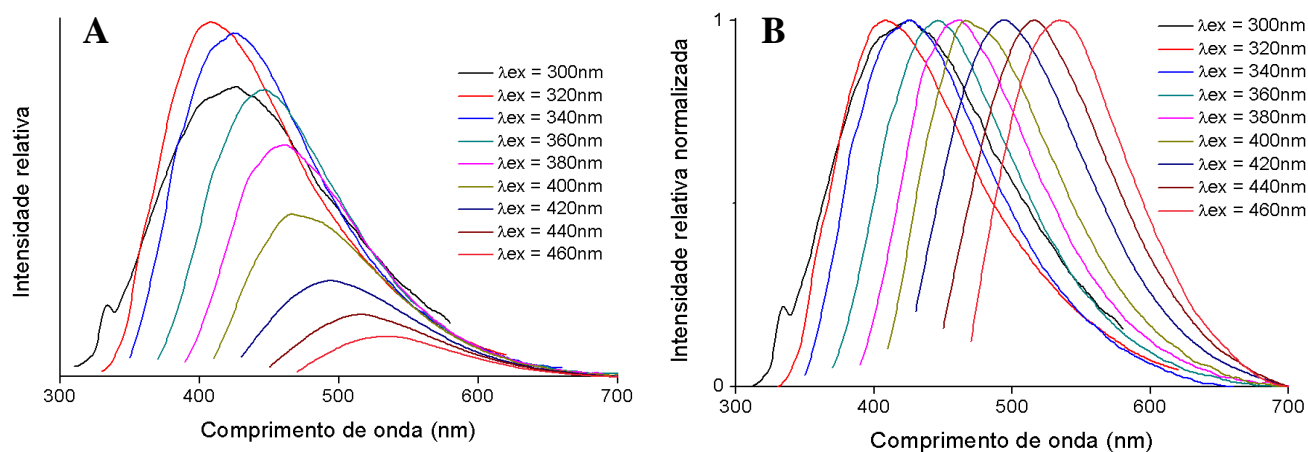


Figura III.14 – Espectros de fluorescência de CNPs G (A) e respectivos espectros normalizados (B).

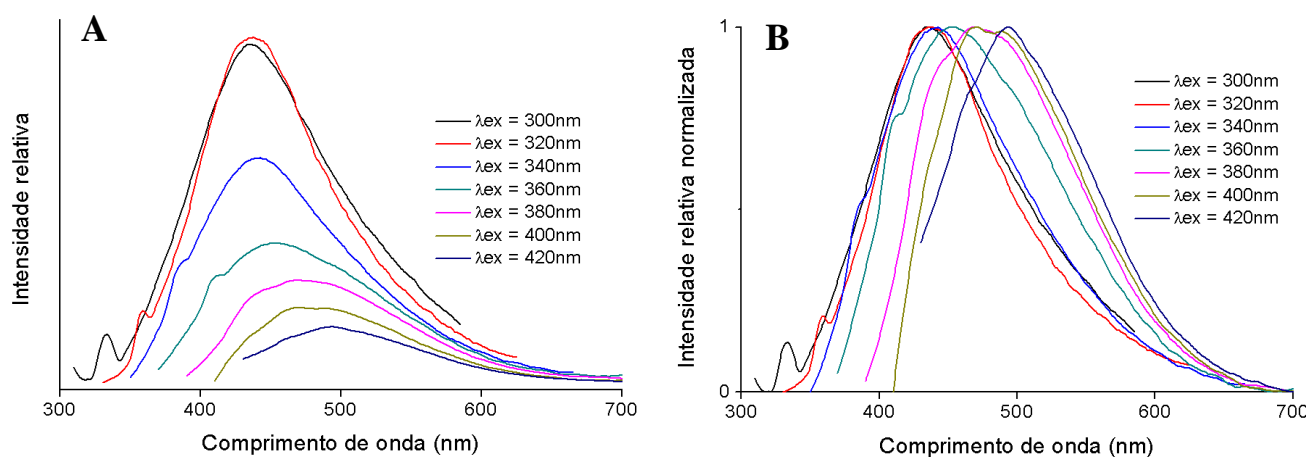


Figura III.15 – Espectros de fluorescência de CNPs CL (A) e respectivos espectros normalizados (B).

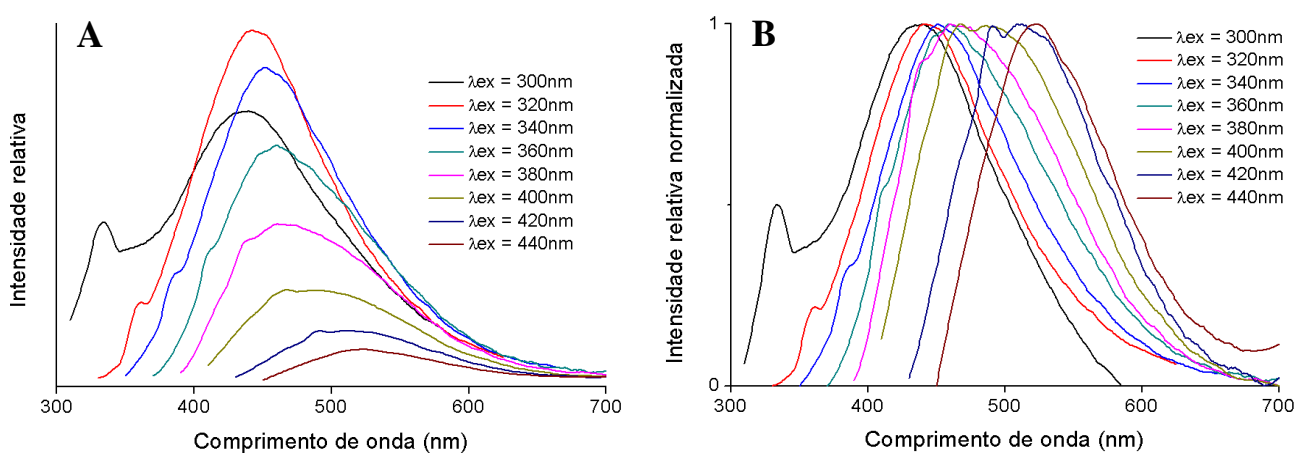


Figura III.16 – Espectros de fluorescência de CNPs 180 (A) e respectivos espectros normalizados (B).

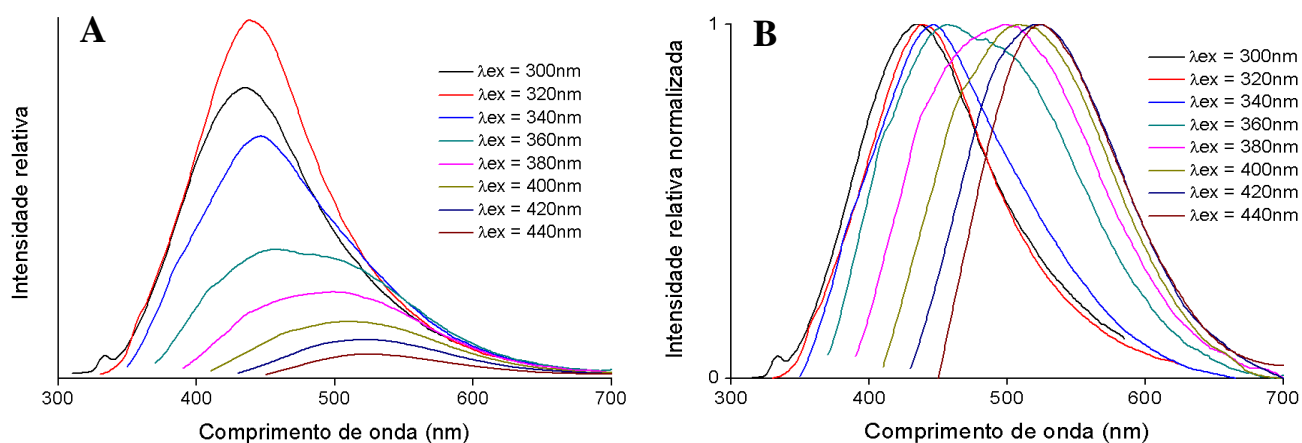


Figura III.17 – Espectros de fluorescência de CNPs 220 (A) e respectivos espectros normalizados (B).

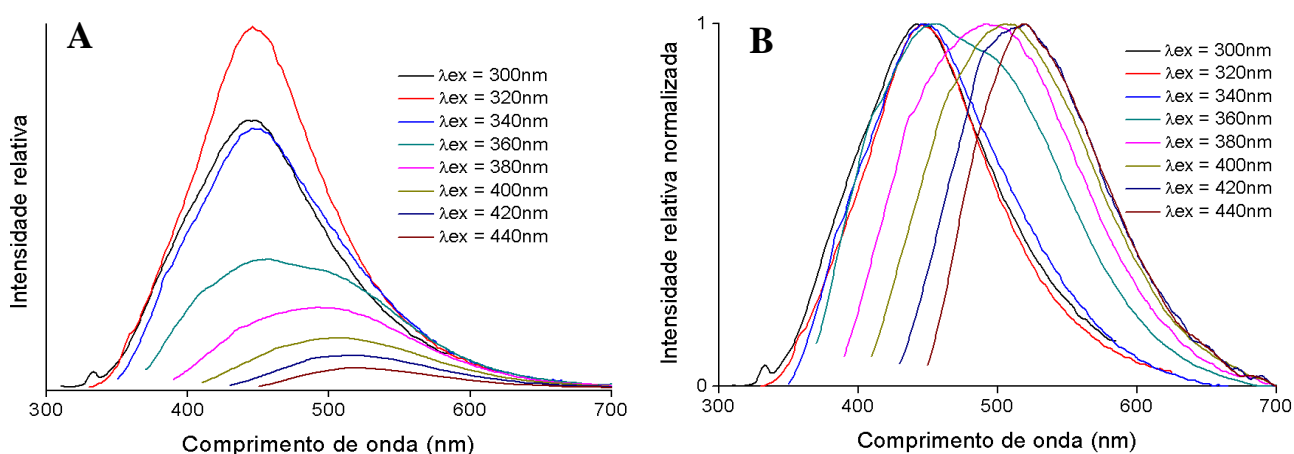


Figura III.18 – Espectros de fluorescência de CNPs 260 (A) e respectivos espectros normalizados (B).

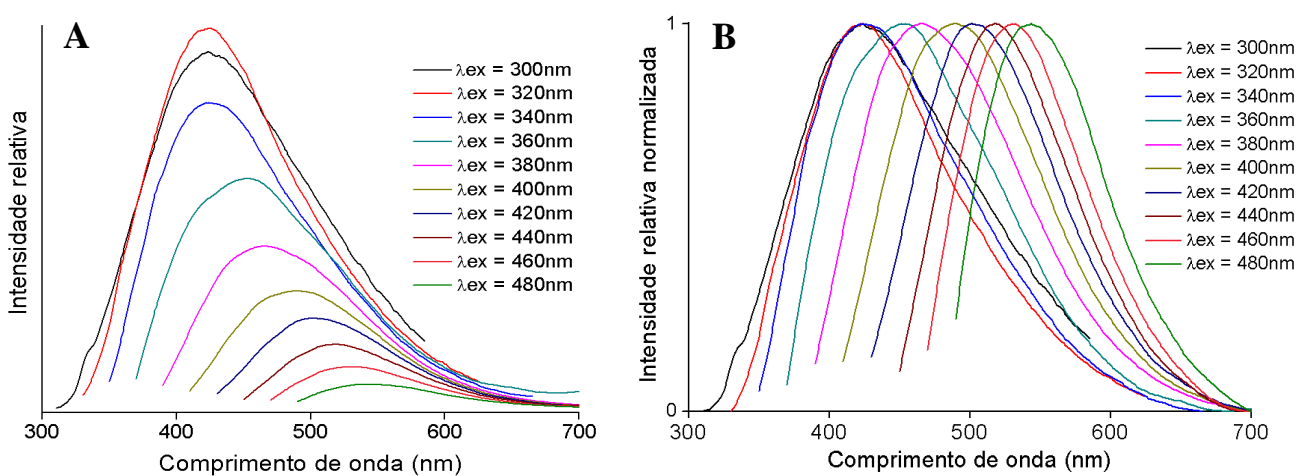


Figura III.19 – Espectros de fluorescência de CNPs 300 (A) e respectivos espectros normalizados (B).

Através da visualização dos espectros de fluorescência verifica-se que os perfis de emissão são diferentes em todas as amostras e que a emissão é dependente do CDO de excitação. Em todas CNPs, com exceção das CNPs AC E, existe um nítido deslocamento da emissão de fluorescência para o vermelho com o aumento do CDO de excitação, uma característica reconhecida das CNPs. As maiores intensidades de emissão verificam-se para CDOs de excitação mais baixos. A intensidade de fluorescência aumenta desde a excitação a 300nm até atingir o máximo, para depois decrescer gradualmente com o aumento do CDO de excitação. Estas variações são típicas deste tipo de NPs. As CNPs AC E também fogem à regra neste aspecto. Verificam-se também outras particularidades das CNPs como a assimetria dos espectros e curvas de emissão bastante largas.

Os espectros de fluorescência das CNPs PVP, CNPs PAA, CNPs G e CNPs obtidas por carbonização simples (figuras III.11 e III.13-19) apresentam nitidamente os típicos perfis de emissão assimétricos das CNPs com prolongamento da emissão na direção do vermelho. Verifica-se que os perfis de fluorescência mais intensos das CNPs PVP, CNPs PAA e CNPs G apresentam emissão de fluorescência mais intensa no UV próximo e violeta com máximos absolutos com excitação a 320nm (CNPs PVP e CNPs PAA – tabela III.5) e 330nm (CNPs G – tabela III.5). Os perfis com maior intensidade de fluorescência das CNPs obtidas a partir da carbonização de cortiça exibem emissão intensa no violeta e azul com máximo absoluto quando o CDO de excitação é 320nm ou 330nm (ver tabela III.6). Já para as CNPs CL o máximo absoluto de emissão ocorre quando são excitadas a 310nm (ver tabela III.6) com a amostra a emitir fortemente no anil. Note-se que todos os perfis de emissão são diferentes entre si. Apenas para as CNPs 220 e CNPs 260 são muito similares (comparar figuras III.18 e III.17). Tal pode ser indicativo de que a variação de temperatura na carbonização de cortiça entre as duas sínteses (40°C) não seja muito preponderante e, portanto, que estas CNPs possuam estruturas semelhantes. De maneira geral, com exceção da semelhança verificada entre CNPs 220 e CNPs 260, é possível dizer que de precursores diferentes e, para o caso da cortiça, diferentes temperaturas resultem CNPs com diferentes estruturas. Logo é natural que os cromóforos responsáveis pela emissão também sejam diferentes.

O comportamento da emissão nas CNPs AC E (figura III.12) é particularmente interessante. A fluorescência é mais forte no verde com a luz excitatória de maior energia usada. Depois existe um deslocamento do máximo de emissão para o azul até à excitação a 340nm. A partir deste CDO, ocorre o típico deslocamento do máximo da fluorescência o vermelho com o aumento do CDO de excitação. A emissão é máxima a 360nm (máximo quase igualado com excitação a 300nm). Observando o espectro de emissão aquando da excitação entre 300 e 330nm, os perfis de emissão aparentam ser a sobreposição de duas curvas centradas em CDOs diferentes. Este comportamento não é exibido por nenhuma outra amostra e sugere a presença de dois tipos distintos de cromóforos.

Tabela III.5 – Parâmetros espectroscópicos de emissão das CNPs obtidas por síntese hidrotérmica.

Parâmetros ópticos	CNPs PVP	CNPs AC E	CNPs PAA	CNPs G
$\lambda_{em\ máx}$	404nm ($\lambda_{ex} = 320nm$)	438nm ($\lambda_{ex} = 360nm$)	382nm ($\lambda_{ex} = 320nm$)	414nm ($\lambda_{ex} = 330nm$)
FWHM	102nm ($\lambda_{ex} = 320nm$)	107nm ($\lambda_{ex} = 360nm$)	87nm ($\lambda_{ex} = 320nm$)	124nm ($\lambda_{ex} = 330nm$)
Φ	11% ($\lambda_{ex} = 360nm$)	10% ($\lambda_{ex} = 360nm$)	6% ($\lambda_{ex} = 360nm$)	4% ($\lambda_{ex} = 360nm$)

Tabela III.6 – Parâmetros espectroscópicos de emissão das CNPs obtidas por carbonização simples.

Parâmetros ópticos	CNPs CL	CNPs 180	CNPs 220	CNPs 260	CNPs 300
$\lambda_{em\ máx}$	438nm ($\lambda_{ex} = 310nm$)	440nm ($\lambda_{ex} = 320nm$)	439nm ($\lambda_{ex} = 320nm$)	446nm ($\lambda_{ex} = 330nm$)	427nm ($\lambda_{ex} = 320nm$)
FWHM	114nm ($\lambda_{ex} = 310nm$)	118nm ($\lambda_{ex} = 320nm$)	106nm ($\lambda_{ex} = 320nm$)	108nm ($\lambda_{ex} = 330nm$)	137nm ($\lambda_{ex} = 320nm$)
Φ	2% ($\lambda_{ex} = 360nm$)	2% ($\lambda_{ex} = 360nm$)	5% ($\lambda_{ex} = 360nm$)	5% ($\lambda_{ex} = 360nm$)	3 % ($\lambda_{ex} = 360nm$)

Os FQYs calculados variam entre 2 e 11%. Através das tabelas III.5-6 podemos verificar que os FQYs determinados demonstram que as NPs sintetizadas por via hidrotérmica são as mais emissivas. É interessante verificar que nas CNPs obtidas a partir da carbonização da cortiça, o FQY aumenta com o aumento da temperatura de carbonização até 5% quando a temperatura de síntese é 260°C. As NPs produzidas pela carbonização a 300°C são menos emissivas, com um FQY de 3%. A diferença de FQYs entre CNPs produzidas por via hidrotérmica e carbonização simples não é surpreendente. Considerando a necessidade de grupos funcionais na superfície das CNPs para a sua luminescência e tendo em conta que o método hidrotérmico é feito em solução aquosa sob condições extremas, é natural que as CNPs produzidas por esta via contenham grupos funcionais polares (oxigenados e/ou azotados) na superfície das CNPs que na superfície de CNPs produzidas por carbonização em que existe uma forte degradação térmica mas em que a oxidação ao ar é mais moderada.

Na maioria das amostras de CNPs a fluorescência é mais intensa no violeta e azul com máximos absolutos de emissão entre os 404 e os 446nm. As exceções são as CNPs PAA, que têm máximo de emissão no UV próximo a 382nm e as CNPs AC E que emitem intensamente no verde e no azul, com máximo absoluto de emissão a 438nm.

Os espectros das CNPs onde a emissão é a mais intensa têm FWHM com amplitudes a variar entre os 87 e os 137nm. Larguras de banda elevadas são típicas deste tipo de NPs. As FWHM para os restantes perfis de emissão não foram determinadas mas, pela observação dos espectros normalizados, podemos inferir que terão aproximadamente os mesmos valores (notar que o efeito de Raman distorce ligeiramente a percepção nalguns casos). A exceção serão os perfis de emissão das CNPs AC E com CDO de excitação inferior a 340nm com FWHMs claramente maiores.

Além dos espectros de emissão também foram adquiridos espectros de excitação para cada amostra de CNPs. A obtenção destes espectros é possível invertendo o funcionamento dos monocromadores. Assim no registo de espectros de excitação o monocromador de emissão é mantido fixo num CDO e o monocromador da excitação faz o varrimento. Um espectro de excitação permite assim determinar quais as características de absorção das espécies que estão a contribuir para o respectivo espectro de emissão. Os espectros de excitação foram obtidos fixando a emissão no CDO apropriado, incrementando 10nm a cada nova aquisição mas para facilitar a percepção apresentam-se os espectros de excitação recolhidos a CDO em intervalos de 20nm.

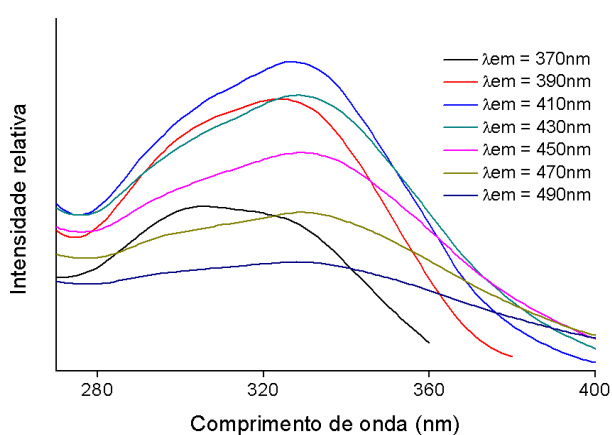


Figura III.20 – Espectros de excitação de CNPs PVP.

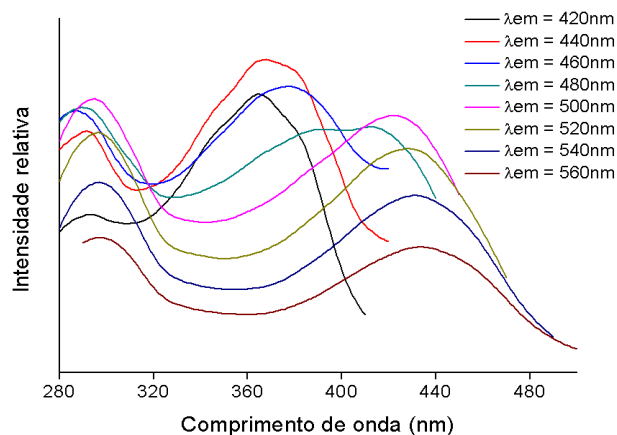


Figura III.21 – Espectros de excitação de CNPs AC E.

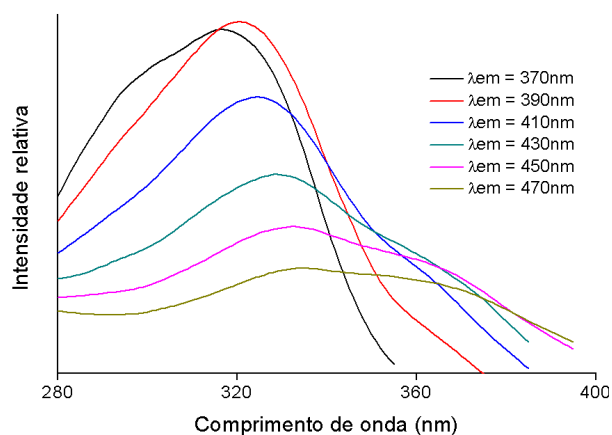


Figura III.22 – Espectros de excitação de CNPs PAA.

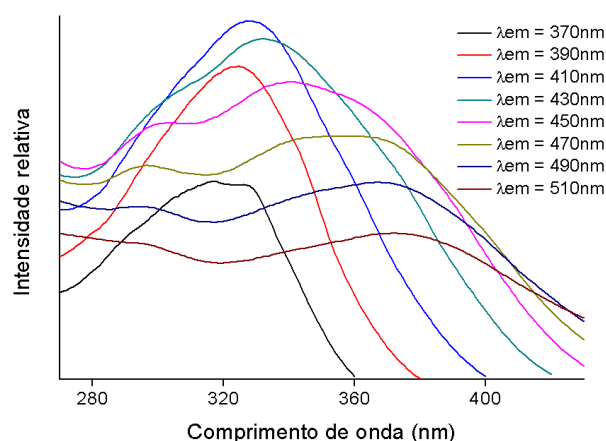


Figura III.23 – Espectros de excitação de CNPs G.

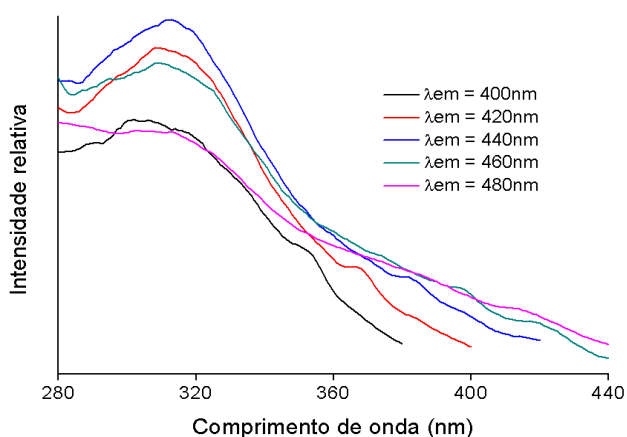


Figura III.24 – Espectros de excitação de CNPs CL.

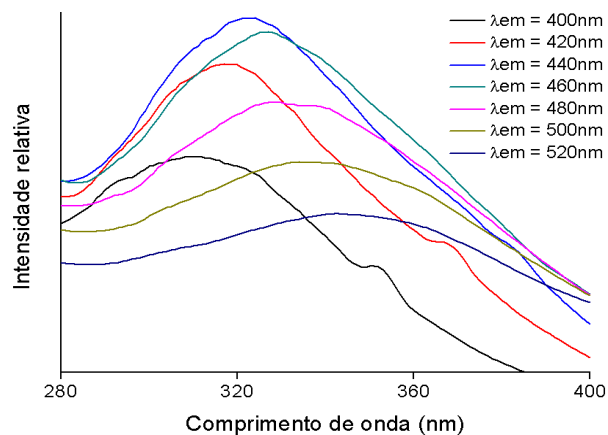


Figura III.25 – Espectros de excitação de CNPs 180.

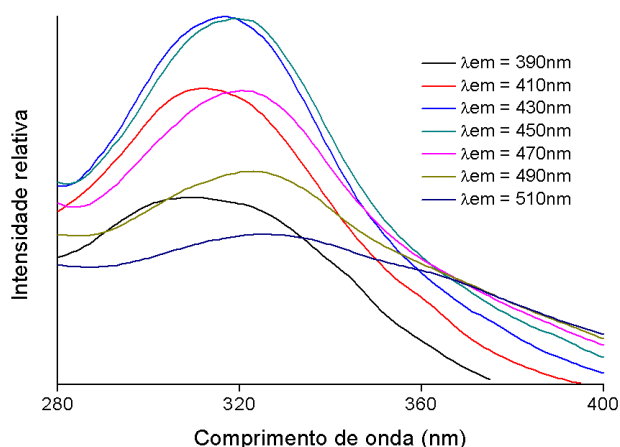


Figura III.26 – Espectros de excitação de CNPs 220.

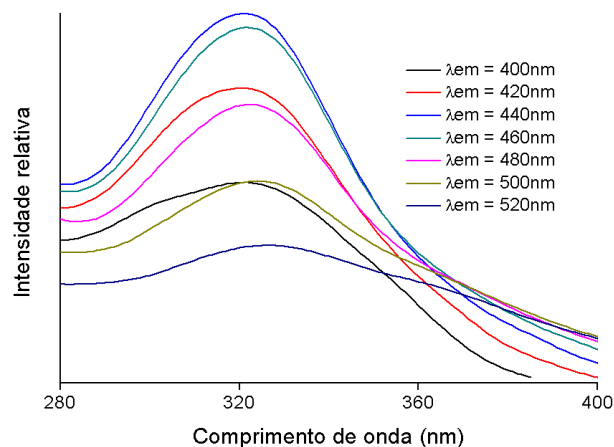


Figura III.27 – Espectros de excitação de CNPs 260.

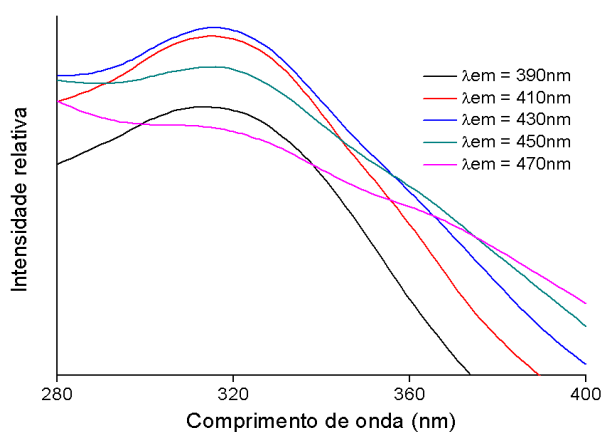


Figura III.28 – Espectros de excitação de CNPs 300.

Através da visualização dos espectros de excitação conseguimos reconhecer que existem CNPs em que a fluorescência varia consoante a excitação de diferentes cromóforos e CNPs em que são sempre os mesmos cromóforos a contribuir para a emissão. Os espectros de excitação permitem ainda constatar que os cromóforos responsáveis pela emissão de fluorescência destas NPs absorvem no UV próximo. As CNPs AC E são a exceção e absorvem no UV próximo e no visível (violeta e azul).

Verifica-se que para as CNPs PVP, CNPs PAA, CNPs G, CNPs 180 e CNPs 220 um deslocamento do máximo de absorção para o vermelho, sugestivo da que a excitação de diferentes cromóforos é responsável pela emissão a diferentes CDOs (figuras III.20, III.22-23 e III.25-26).

Nas CNPs CL, CNPs 260 e CNPs 300 os máximos de absorção mantêm-se praticamente invariáveis à medida que se vai varrendo os CDOs de emissão (figuras III.24 e III.27-28). Tal facto aponta para uma emissão de fluorescência global como resultado da excitação dos mesmos cromóforos. Destes espectros concluímos que estes cromóforos absorvem fortemente a cerca de 320nm.

O caso das CNPs AC E é diferente dos restantes (figura III.21). Tendo em conta os seus perfis de emissão tal não surpreende. Estas CNPs exibem duas bandas de absorção distintas no espectro de excitação, o que pressupõe a existência de dois tipos de cromóforos completamente diferentes, como já foi mencionado. A banda da direita tem máximos que vão perdendo intensidade e que se deslocam para o vermelho ao varrer o CDO de emissão. Neste caso deduz-se que há diferentes cromóforos onde, aparentemente, os que absorvem entre 340 e 390nm serão sobretudo responsáveis pela emissão da fluorescência de maior energia. Note-se que a banda centrada a 356nm no espectro de absorção das CNPs AC E (figura III.3) é coincidente com a absorção destes cromóforos responsáveis pela fluorescência de maior energia. Disto inferimos que a banda no espectro de absorção é relativa à transição electrónica destes cromóforos. Na banda da esquerda observa-se um aumento de intensidade à medida que se faz o varrimento dos CDOs de emissão e constata-se que o seu máximo, centrado a cerca de 300nm, varia muito pouco. Verifica-se que o máximo absoluto destes espectros passa da banda da direita para a da esquerda conforme é feito o varrimento da emissão, e que este máximo mantém uma intensidade ligeiramente superior ao banda da direita. Com esta análise deduz-se que a emissão de fluorescência de menor energia é o resultado conjunto da relaxação dos cromóforos que absorvem a cerca de 300nm da banda da esquerda, e da relaxação dos diferentes cromóforos da banda da direita. Tendo em conta as variações verificadas nas duas bandas podemos ainda tirar outra ilação importante: a emissão a CDOs baixos possui deslocamentos de Stokes pequenos e, à medida que se incrementa a emissão, os desvios de Stokes aumentam.

III.2.2 Caracterização morfológica

III.2.2.1 Microscopia electrónica de transmissão

Foram obtidas imagens para todas as amostras de CNPs mas só foi possível encontrar NPs nas amostras CNPs PVP, CNPs G, CNPs 260 e CNPs 300. Nas restantes não foram vistas NPs. Na maioria dos casos houve a formação de um filme muito fino. Estes filmes são formados durante a secagem por polímero residual. Como as CNPs possuem elementos de número atómico baixo, não é esperado um contraste da imagem tão bom como para NPs metálicas. A formação de filmes é responsável pela deterioração do contraste na imagem pois o filme, que é constituído por elementos de número atómico idêntico ao das CNPs, também causa dispersão dos electrões. Nalguns casos o filme rasgava quando o feixe de electrões incidia e enrolava em direcção ao cobre. No caso particular das CNPs armazenadas em solução devia ter sido feita filtração prévia das amostras antes de se adicionar uma gota à respectiva grelha de cobre. Como consequência desta falta, estas amostras mostraram ter aglomerados de pequenas dimensões (de resíduos de polímero e/ou NPs agregadas) em quantidades relevantes.

Das imagens não foi possível obter estatística suficiente para criar histogramas de dimensões. Por esse motivo apresenta-se apenas uma tabela juntamente com cada imagem TEM com carácter meramente elucidativo quanto aos tamanhos medidos por esta técnica.

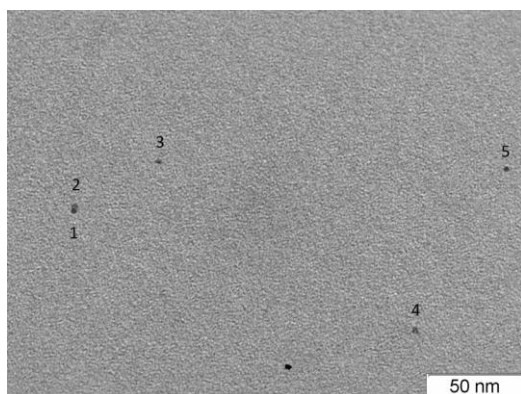


Figura III.29 – Imagem TEM de CNPs PVP.

Tabela III.7 – Tamanhos de CNPs PVP.

Exemplar	1	2	3	4	5
Dimensão (nm)	2,9	2,3	3,0	3,9	2,9

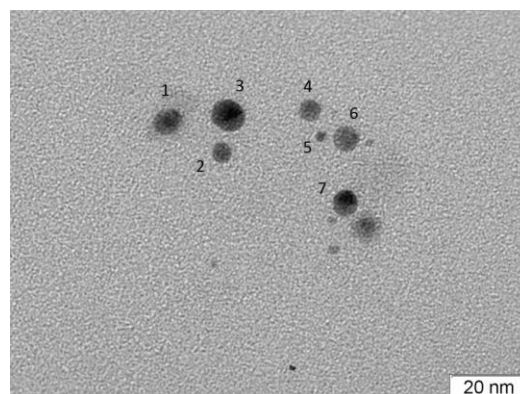


Figura III.30 – Imagem TEM de CNPs G.

Tabela III.8 – Tamanhos de CNPs G.

Exemplar	1	2	3	4	5	6	7
Dimensão	6,4	5,4	9,4	5,9	2,9	7,1	6,3

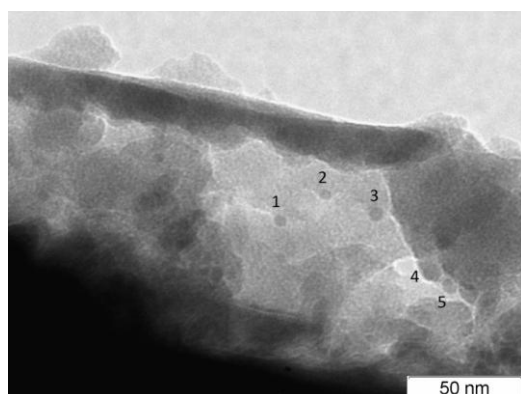


Figura III.31 – Imagem TEM de CNPs 260. O filme fino formado enrolou em direcção ao cobre.

Tabela III.9 – Tamanhos de CNPs 260.

Exemplar	1	2	3	4	5
Dimensão (nm)	6,1	5,4	6,7	8,0	5,9

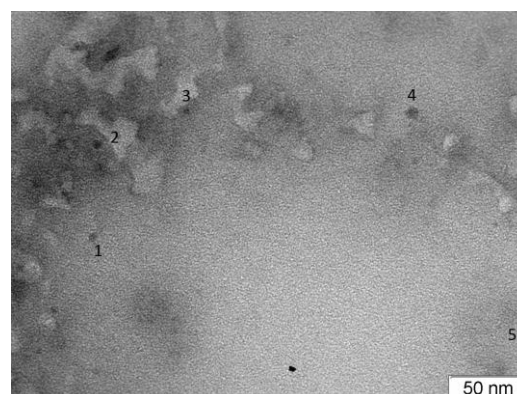


Figura III.32 – Imagem TEM de CNPs 300.

Tabela III.10 – Tamanhos de CNPs 300.

Exemplar	1	2	3	4	5
Dimensão (nm)	6,2	6,1	4,9	8,7	4,7

Verifica-se que as CNPs PVP e CNPs G (figuras III.29-30) apresentam um contraste superior ao das CNPs 260 e CNPs 300 (figuras III.31-32). A justificação para o facto pode residir na falta de filtração destas últimas, visto que é observável algo que parece ser polímero aglomerado em ambas imagens. Estes resíduos prejudicam o contraste das imagens. No caso das CNPs CL, CNPs 180 e CNPs 220 estes lixos não permitiram a distinção de NPs. De notar que nas imagens das CNPs 260 e CNPs 300 existem NPs que não foram identificadas mas os limites da maioria são de difícil detecção. Nas grelhas de cobre com amostras de CNPs PAA e CNPs AC E não se visualizou NPs.

As imagens TEM não permitem um tratamento estatístico das dimensões mas permitem ter uma noção do tamanho das CNPs. Os tamanhos medidos a partir das imagens TEM exibem dimensões inferiores a 10nm (tabelas III.7-10). No caso das CNPs PVP e CNPs G estas dimensões são consistentes com [46] e [48]. Além disso as imagens permitem ver que as CNPs apresentam fundamentalmente formas com simetria esférica.

III.2.2.2 Microscopia electrónica de varrimento

Foram adquiridas imagens SEM para todas as amostras de CNPs. Nas imagens das CNPs PAA e CNPs 260 não são visíveis NPs. Na maioria das imagens SEM notava-se uma clara distorção. Essa distorção dever-se-á fundamentalmente à cobertura das CNPs com um filme fino. Nalguns casos as NPs moviam-se bastante e era impossível adquirir imagens. O facto de a maioria das amostras terem uma cobertura de um filme polimérico fino dificultou a obtenção de imagens com bom contraste. Apesar destas limitações foram tiradas imagens e, mesmo não correspondendo ao tamanho real, permitem a visualização destas nanoestruturas.

Tendo em conta o que foi observado em TEM, constatou-se que a filtração de CNPs armazenadas em solução foi um procedimento correcto para a remoção de pequenos lixos. Nalgumas imagens existem NPs suficientes para fazer um tratamento estatístico e apresenta-se o respectivo histograma de dimensões. Para as restantes adoptou-se a abordagem feita em III.2.2.1.

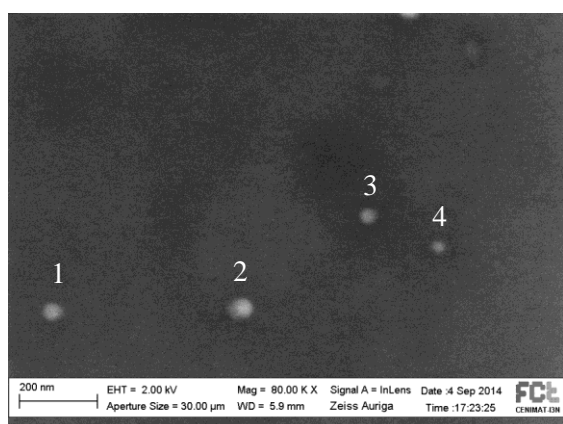


Figura III.33 – Imagem SEM de CNPs PVP.

Tabela III.11 – Tamanhos de CNPs PVP.

Exemplar	1	2	3	4
Dimensão (nm)	46	47	26	25

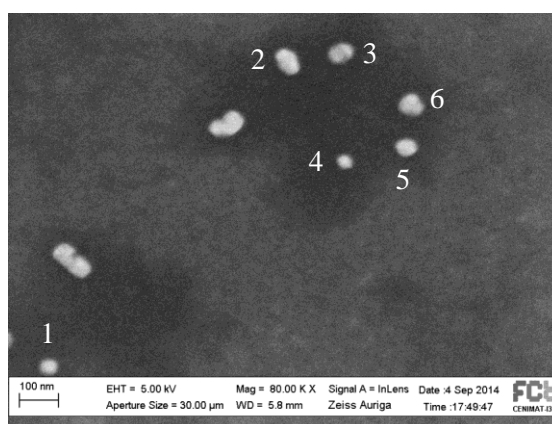


Figura III.34 – Imagem SEM de CNPs CL.

Tabela III.12 – Tamanhos de CNPs CL.

Exemplar	1	2	3	4	5	6
Dimensão (nm)	46	64	47	36	46	54

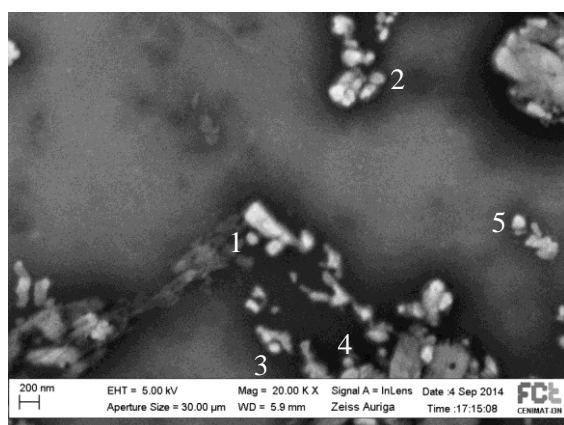


Figura III.35 – Imagem SEM de CNPs 180.

Tabela III.13 – Tamanhos de CNPs 180.

Exemplar	1	2	3	4	5
Dimensão (nm)	108	121	104	98	130

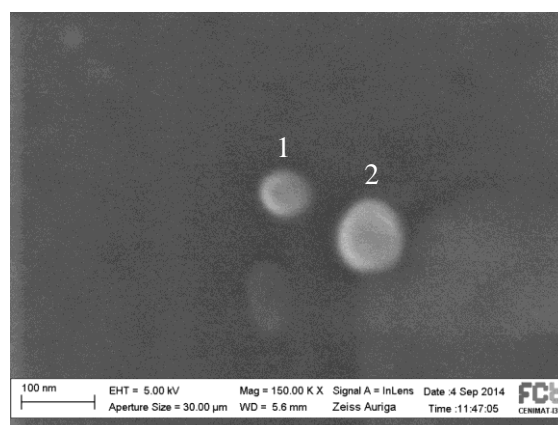


Figura III.36 – Imagem SEM de CNPs 220.

Tabela III.14 – Tamanhos de CNPs 220.

Exemplar	1	2
Dimensão (nm)	64	86

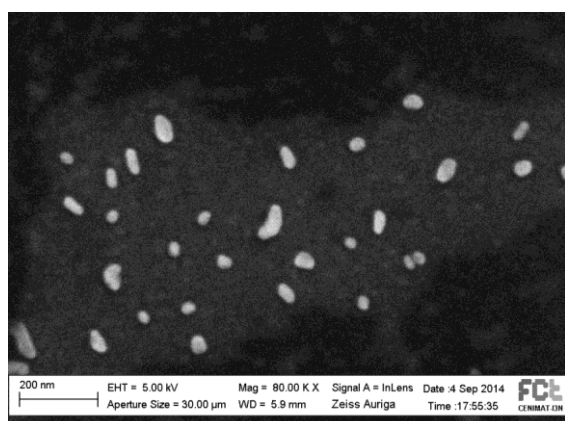


Figura III.37 – Imagem SEM de CNPs AC E.

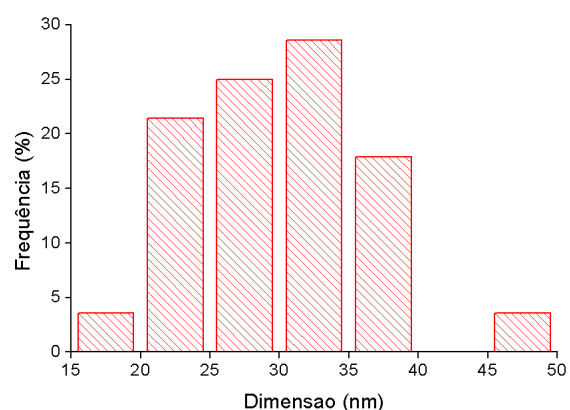


Figura III.38 – Histograma de dimensões de CNPs AC E.

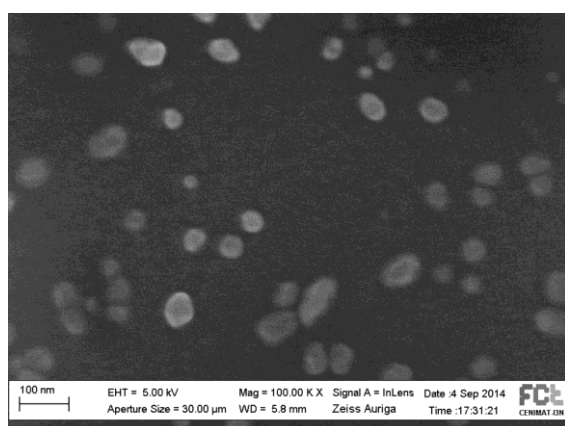


Figura III.39 – Imagem SEM de CNPs G.

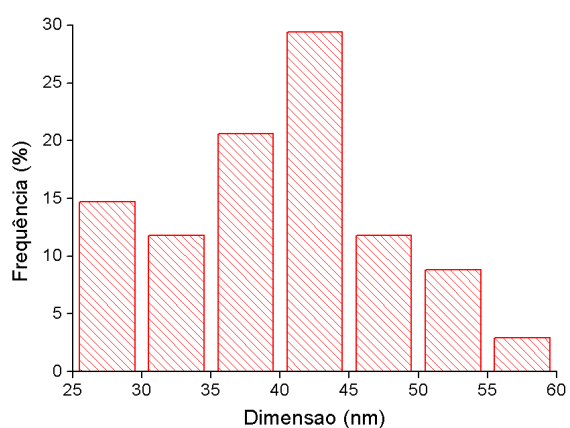


Figura III.40 – Histograma de dimensões de CNPs G.

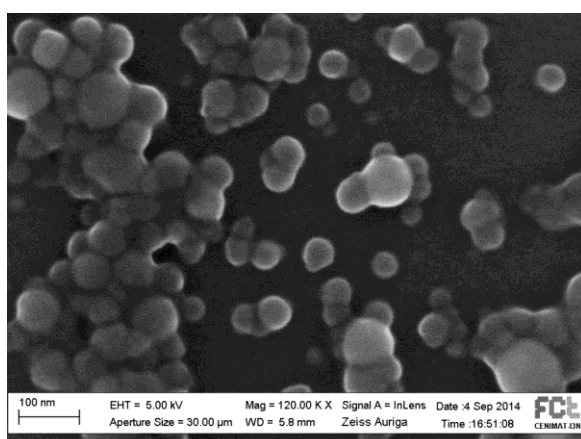


Figura III.41 – Imagem SEM de CNPs 300.

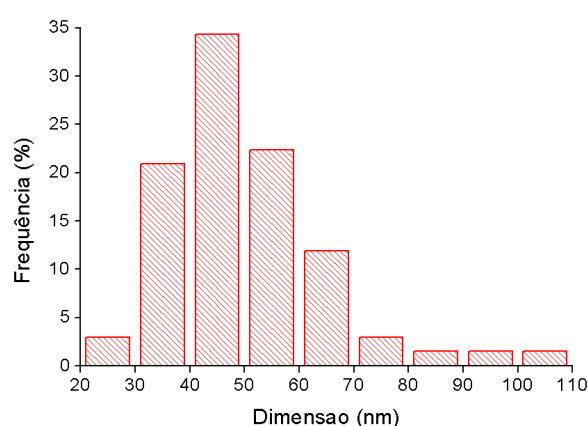


Figura III.42 – Histograma de dimensões de CNPs 300.

Nas imagens SEM das CNPs PVP e CNPs G é evidente o fraco contraste na imagem das NPs, provavelmente, devido ao filme fino de polímero que as envolve (figuras III.33 e III.39). Aquando da visualização das CNPs AC E por SEM (figura III.37) observava-se nitidamente o movimento das NPs devido à interação com o feixe de electrões. A consequência é uma forte

distorção das imagens obtidas. Para o histograma destas CNPs (figura III.38) foram contabilizadas apenas as NPs com formas mais esféricas.

Os tamanhos medidos para as CNPs PVP estão acima de 24nm (tabela III.11) e as dimensões médias determinadas a partir das NPs seleccionadas para criar os histogramas de CNPs AC E e CNPs G (figuras III.38 e III.40 respectivamente) são 30nm e 40nm, respectivamente. Como os tamanhos medidos estão em completo desacordo com [46] [47] [48], destas imagens apenas podemos mencionar a forma quase esférica destas CNPs, se ignorarmos algumas das partículas nas imagens de CNPs AC E e CNPs G que, ou são aglomerados, ou são NPs extremamente distorcidas.

Genericamente as imagens SEM das CNPs obtidas por carbonização a seco exibem melhor qualidade, embora o contraste esteja longe do ideal excepto para as CNPs 300.

Relativamente às CNPs CL, estas aparentam ter formas esféricas (figura III.34). A interpretação da imagem é difícil pois o contraste não é bom e isso dificulta a distinção de aglomerados que parecem estar presentes e podem ser identificados erroneamente como NPs. Por este mesmo motivo os tamanhos medidos (tabela III.12) também não são fiáveis.

No que toca à imagem SEM das CNPs 180 (figura III.35) observam-se sobretudo resíduos poliméricos que dificultam a distinção de NPs. Além dos resíduos, parecem existir NPs com formas e tamanhos variados. São identificadas algumas NPs por terem uma forma mais esférica. Os tamanhos destas CNPs identificadas parecem rondar os 100nm (ver tabela III.13). Das CNPs 220 apenas se obteve uma imagem numa região onde existia pouco lixo (figura III.36). O contraste da imagem é mau mas parece ser evidente que as NPs têm forma esférica. Mais uma vez a fraca qualidade da imagem não permite a identificação do tamanho real das CNPs visíveis.

Para as CNPs 300 foram adquiridas as imagens SEM com melhor contraste. Na imagem apresentada (figura III.41) é perfeitamente claro que estas NPs possuem formas esféricas. As CNPs 300 têm uma dimensão média de 50,5nm com uma distribuição de tamanhos consideravelmente larga (figura III.42). Através das imagens SEM parece existir uma redução gradual dos tamanhos das NPs obtidas a partir da carbonização da cortiça com a temperatura mas, infelizmente, a fraca qualidade das imagens de CNPs 180 e CNPs 220 e a insuficiência de dados não permitem corroborar esta suposição.

III.2.2.3 Dispersão dinâmica da luz

Com a técnica de DLS pretendeu-se a determinação dos diâmetros hidrodinâmicos das CNPs. A técnica é simples de usar e o equipamento fácil de manusear. Obtiveram-se tamanhos para três amostras: CNPs PVP, CNPs CL e CNPs 300. Não é claro o motivo pelo qual existem CNPs sem sinal e outras com bom sinal.

Para apresentar os resultados das três amostras, foi selecionado um dos ensaios com melhor sinal: para cada amostra, foi escolhido um ensaio à concentração em que os dados obtidos apresentem maior concordância, ou seja, com índices de polidispersividade mais baixos e com tamanhos médios (*Z-average*) que sejam consensuais nessa concentração. A grande semelhança entre *Z-averages* e índices de polidispersividade nos ensaios feitos a uma dada concentração aponta para as condições experimentais ideais em DLS. Com efeito, foi verificado que se tivesse sido escolhido outro ensaio à mesma concentração a respectiva distribuição de tamanhos seria

praticamente a mesma. Adicionalmente existia também uma grande similitude entre dados obtidos a diferentes concentrações. Tendo isto em conta, estes resultados são considerados bastante precisos.

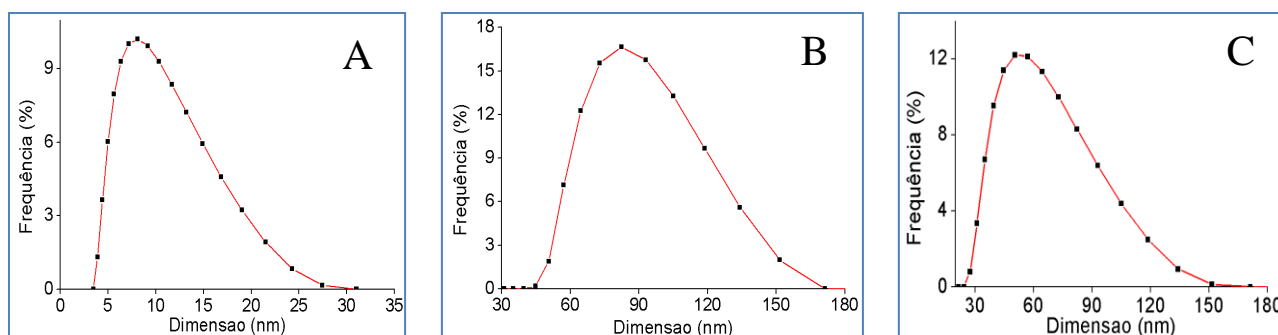


Figura III.43 – Distribuição de tamanhos DLS de CNPs PVP (A), CNPs CL (B) e CNPs 300 (C).

Tabela III.15 – Medições obtidas por DLS.

Amostra	Z-average (nm)	Índice de polidispersividade
CNPs PVP	8,8	0,19
CNPs CL	86	0,25
CNPs 300	48	0,49

A distribuição de tamanhos determinados por DLS das CNPs PVP é bastante diminuta (figura III.43 A). O diâmetro médio destas CNPs determinado pelo método dos cumulantes (*Z-average*) é 8,8nm e o índice de polidispersividade é relativamente baixo (tabela III.15). As CNPs CL e CNPs 300 possuem distribuições de tamanhos maiores (figura III.43 B e C) com valores de *Z-average* uma ordem de grandeza mais elevada: 86 e 48nm para as CNPs CL e CNPs 300, respectivamente; os índices de polidispersividade apresentam valores superiores (ver tabela III.15).

Habitualmente os tamanhos medidos por DLS são maiores que as dimensões reais, pois referem-se ao raio hidrodinâmico (o *software* do aparelho usado calcula directamente os diâmetros através do algoritmo dos cumulantes). Adicionalmente, com a técnica DLS, as partículas de maiores dimensões têm maior peso nos resultados pois dispersam mais a luz, mesmo que em número francamente inferior face a NPs de tamanhos mais reduzidos. Neste sentido a análise por DLS das CNPs PVP está em concordância com as dimensões esperadas para estas NPs [46] e com a análise TEM. No que diz respeito às CNPs CL e CNPs 300, a análise dos resultados obtidos por DLS está em concordância com as dimensões observadas na análise feita por SEM mas, para as CNPs 300, não está de acordo com as dimensões apuradas por TEM. No entanto realça-se que em SEM se obtiveram imagens de CNPs 300 com excelente contraste. Assim a forte correlação entre os resultados determinados por DLS e os obtidos por SEM para as CNPs 300 ganha destaque.

A amostra de CNPs AC E, em solução, é muito escura mesmo a baixas concentrações e absorve a luz incidente (535nm). Após terem sido tentadas medições para várias diluições chegou-se à conclusão que não era possível arranjar um compromisso entre absorvância e concentração de CNPs dentro do regime de detecção do instrumento.

Não existe uma explicação certa para a impossibilidade na obtenção de sinal de DLS para as CNPs PAA e CNPs G. Tendo em conta que foi possível obter sinal para as CNPs PVP, era esperado

que também fosse possível para estas NPs. Foram feitos ensaios para várias concentrações que não tiveram sucesso. Quanto às CNPs 180, CNPs 220 e CNPs 260 também não foi possível obter sinal de DLS. A explicação pode residir na baixa concentração de NPs em solução: os rendimentos de reacção são aparentes e as quantidades de produto não reflectem a massa real em NPs.

III.2.2.4 Difrakção por raios-X

Com a técnica DRX pretende-se simplesmente averiguar se as amostras de CNPs são nanoestruturas com carácter cristalino ou amorfo.

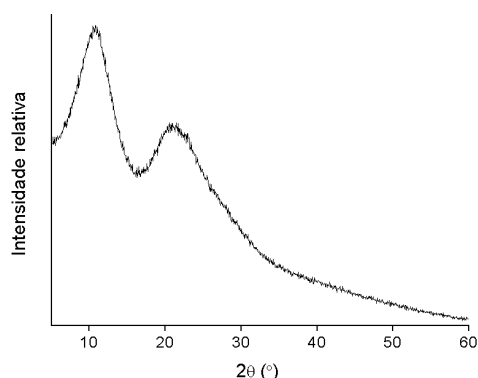


Figura III.44 – Difractograma de CNPs PVP.

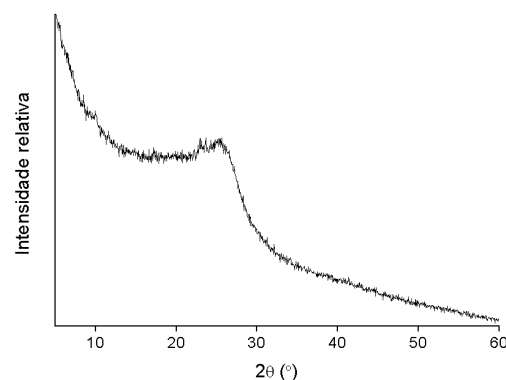


Figura III.45 – Difractograma de CNPs AC E.

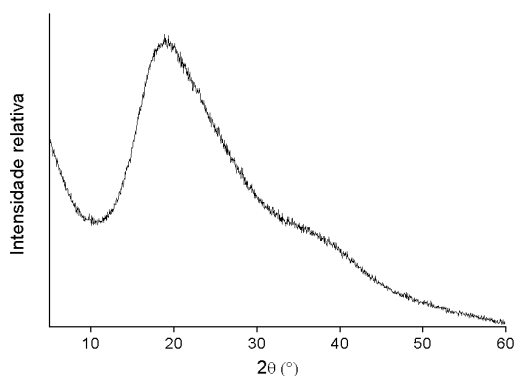


Figura III.46 – Difractograma de CNPs PAA.

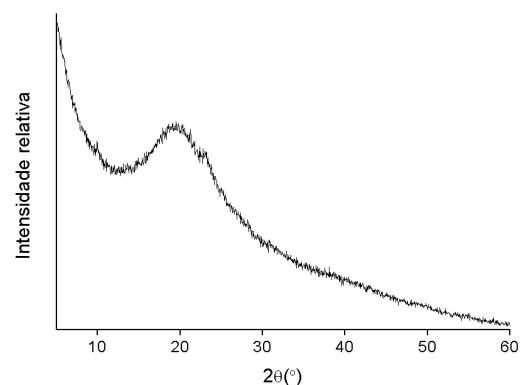


Figura III.47 – Difractograma de CNPs G.

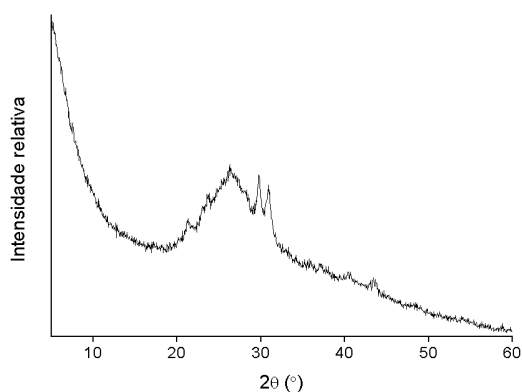


Figura III.48 – Difractograma de CNPs CL.

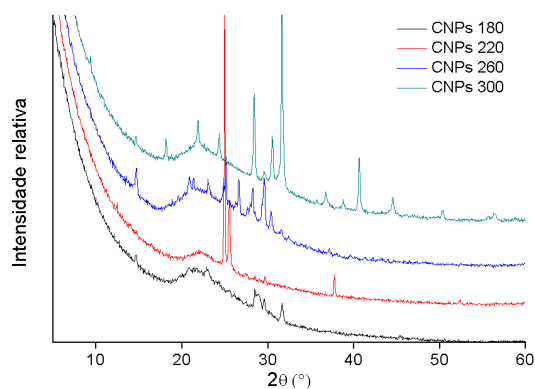


Figura III.49 – Difractogramas de CNPs 180, CNPs 220, CNPs 260 e CNPs 300.

Em relação às CNPs obtidas por síntese hidrotérmica verificámos que em todas as amostras existe uma banda larga com centros localizados entre os 20 e os 25°. Estas bandas são o resultado da sobreposição de múltiplos picos de difracção devido à desorganização estrutural dos átomos nas CNPs e portanto, estas CNPs possuem natureza amorfa [23] [63].

No caso das CNPs PVP (figura III.44) existe uma segunda banda larga centrada a cerca de 11° que é típica da PVP à qual se aplica o argumento anterior e que também reflecte natureza amorfa [64]. No difractograma das CNPs AC E parecem existir sobreposições desde ângulos muito baixos, sendo impossível distinguir o início da banda (figura III.45). Para amostra CNPs PAA, é visível a sobreposição de duas bandas largas, uma centrada a cerca de 20° mais intensa e outra por volta dos 35° (figura III.46). No difractograma das CNPs CL (figura III.47) verifica-se a existência de uma banda larga centrada a cerca de 28° atribuída a desorganização da estrutura atómica das NPs e observa-se ainda a presença de alguns picos nesta banda que poderão indicar uma fase cristalina na amostra de CNPs. Aparentemente a estrutura destas CNPs tem carácter semi-cristalino.

No que toca à análise dos difractogramas das CNPs produzidas por carbonização de cortiça (figura III.49) observa-se em todos difractogramas uma banda larga, tal como a visualizada nas CNPs obtidas por síntese hidrotérmica, que está centrada a 22°. Observam-se também vários picos estreitos, típicos de estruturas cristalinas. Durante os ensaios SEM eram visíveis cristais que se formaram devido à secagem. Tendo em conta que as CNPs sintetizadas a partir de cortiça não foram dialisadas é provável que as amostras estejam contaminadas com os sais que formaram os cristais visíveis em SEM. Estes picos estreitos serão resultado da difracção por cristais formados por estes sais que, apesar de serem em muito menor quantidade que as CNPs, difractam fortemente os raios-X. No entanto é estranho que não haja grande correlação destes picos entre as diferentes amostras. Reunindo estas informações, acredita-se que estas CNPs possuam uma estrutura desorganizada, ou seja, são de natureza amorfa tendo por base a larga banda comum a todas as amostras nos difractogramas, e que os picos estreitos apareçam nos difractogramas devido a cristais formados por sais existentes em solução.

III.2.3 Caracterização da estrutura química

III.2.3.1 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Para identificar os grupos funcionais presentes nas CNPs foi feita uma análise FTIR detalhada de cada amostra bem como das moléculas precursoras usadas na síntese hidrotérmica. Assim é possível verificar se existem evoluções na estrutura química resultantes do tratamento hidrotérmico. Relativamente às carbonizações a seco, apenas se obtiveram os espectros das CNPs. Não se apresenta o espectro das CNPs 220 devido a pobre qualidade deste.

Os espectros são apresentados numa gama entre os 3800 e os 750cm⁻¹. Acima de 3800cm⁻¹ não se verifica absorção em nenhuma das amostras. Por outro lado, com a técnica de amostragem ATR utilizada, as absorvâncias obtidas a NDOs inferiores a 750cm⁻¹ deixam de ser fiáveis. A região das impressões digitais (*fingerprint*) de cada amostra (1500 a 750cm⁻¹) também foi identificada embora a atribuição dos picos e bandas seja feita com menor fiabilidade relativamente ao restante

espectro. A análise FTIR dos precursores usados em sínteses hidrotérmicas, apresentada no apêndice A, é bastante útil na análise dos espectros das respectivas CNPs.

Em ATR as amostras estão expostas ao ar. Picos ou bandas juntos a 2350cm^{-1} são atribuídos ao CO_2 atmosférico a menos que sejam particularmente intensos. Também é importante ter em conta que a linha de base não é uniforme nas CNPs de cortiça. Isto deve-se às diferentes espessuras da amostra no silício. A atribuição de picos e bandas de absorção no IV foi feita de acordo com [65], [66] e [67]. Apresentam-se seguidamente os espectros de IV para cada amostra de CNPs com a análise respectiva a cada tipo de CNPs feita nas tabelas III.16-21.

Tabela III.16 – Atribuição de picos a CNPs PVP.

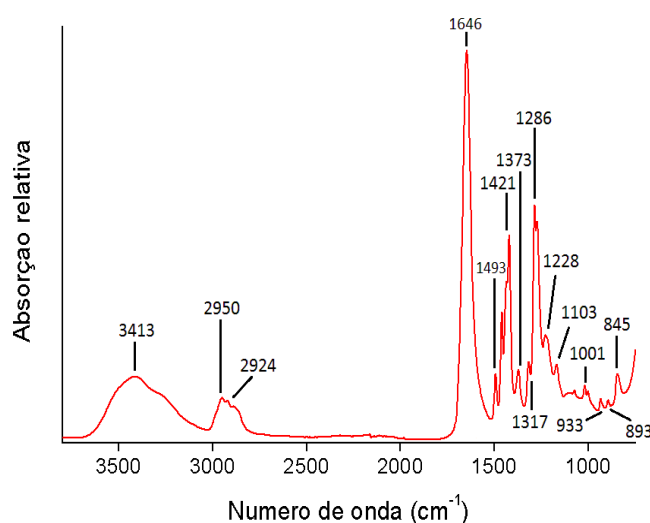


Figura III.50- Espectro FTIR de CNPs PVP.

Absorção (cm^{-1})	Ligação	Modo de vibração	Grupo funcionais
845	C-H	Deformação	Alcano
893	C-H	Deformação	Alcano
933	C-H	Deformação	Alcano
1001	C-H	Deformação	Alcano
1103	C-N	Deformação	Amida
1228	C-N	Deformação	Amida
1286	C-H	Deformação	Alcano
1317	C-H	Deformação	Alcano
1373	C-H	Deformação	Alcano
1421	C-H	Deformação	Alcano
1493	C-H	Estiramento	Alcano
1646	C=O	Estiramento	Amida I
2924	C-H	Estiramento	Alcano
2950	C-H	Estiramento	Alcano
3413	O-H	Estiramento	Água

Comparando o espectro das CNPs PVP (figura III.50) com o espectro da PVP (ver figura A.2 do apêndice A) verifica-se que são idênticos. Os picos e bandas são análogos. Os desvios de número de onda (NDO) estão dentro do limite de resolução do aparelho. A amida está bem identificada pelo intenso pico amida I a 1646cm^{-1} do carbonilo. A única diferença visível é o aumento da intensidade deste pico e pode sugerir o aumento de número de carbonilos nas CNPs como resultado de processos de oxidação ocorridos no decurso da síntese hidrotérmica. A atenuação dos picos a 1016cm^{-1} e 2889cm^{-1} é observada mas não é relevante. A banda centrada a 3413cm^{-1} não se deve à ligação N-H da amida visto ser uma amida terciária (ligação N-H é inexistente em amidas terciárias), mas sim a vibrações O-H de água, que foi absorvida pela amostra higroscópica.

Três situações podem ter ocorrido: a) a temperatura e/ou tempo de síntese foram insuficientes e apenas uma fracção de polímero foi efectivamente transformada em CNPs, b) a quantidade de polímero inicial é demasiado grande para que ocorra uma transformação eficaz em CNPs ou c) a estrutura química das CNPs é muito parecida com a da PVP. Seja qual for o caso, parece existir uma grande fracção de PVP na amostra. No entanto, a presença de CNPs é incontornável devido aos resultados de fluorescência, TEM e SEM. A análise FTIR para as CNPs PAA e CNPs G é análoga à feita para as CNPs PVP e está feita no apêndice A (figuras A.10-11 e tabelas A.5-6).

Tabela III.17 – Atribuição de picos a CNPs AC E.

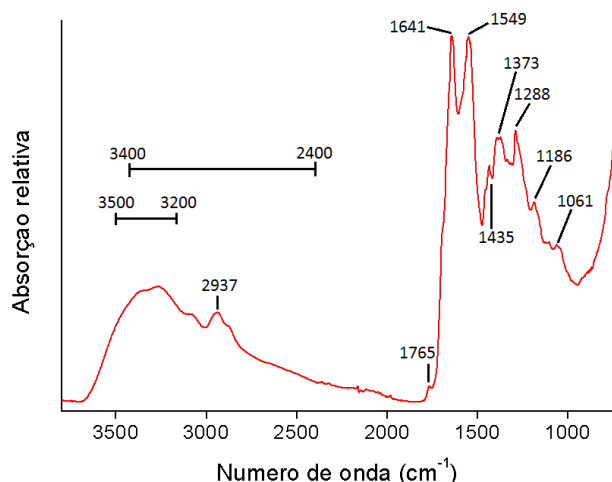


Figura III.51 – Espectro FTIR de CNPs AC E.

Absorção (cm ⁻¹)	Ligação	Modo de vibração	Grupo funcional
1061	C-H C-O	Deformação Estiramento	Aromático Álcool
1186	C-N	Estiramento	Amina
1288	C-O C-O-C C-O	Estiramento Estiramento Estiramento	Éter Epóxido Ácido carb.
1373	C-H	Deformação	Alifático
1435	O-H	Deformação	Ácido carb.
1549	N-H C=C	Deformação Estiramento	Amida II Aromático
1641	C=O	Estiramento	Amida I
1765	C=O	Estiramento	Acilo
2937	C-H	Estiramento	Alcano
[3400-2400]	O-H	Estiramento	Ácido carb.
[3500-3200]	O-H N-H	Estiramento Estiramento	Álcool Amida A

Por oposição com o caso anterior, o espectro FTIR das CNPs AC E (figura III.51) mostra profundas transformações decorrentes da reacção hidrotérmica (comparar com espectros FTIR do ácido cítrico, figura A.4, e da etilenodiamina, figura A.6, no apêndice A). Como as reacções ocorridas no interior do reactor de teflon não são devidamente conhecidas, a análise FTIR torna-se bastante complicada. Ainda assim o espectro revela a presença de grupos funcionais expectáveis.

Um das características mais importantes mostradas no espectro é a formação de ligações amida entre aminas e ácidos carboxílicos evidenciadas pelo pico amida I a 1641cm⁻¹. A absorção no IV por parte de ácidos carboxílicos está parcialmente sobreposta com as amidas mas parece evidente na larga banda de média intensidade típica deste grupo funcional entre os 3400 e 2400cm⁻¹. É provável também a existência de grupos álcool e que a sua larga banda de absorção (3500 a 3200cm⁻¹) esteja sobreposta com a região da amida A. Nesta banda também é esperada a existência de contribuições das vibrações O-H da água. No fundo, ácidos carboxílicos e álcoois são esperados pois estes grupos funcionais existem no ácido cítrico. O pico a 1549cm⁻¹ é, provavelmente, uma sobreposição da absorção amida II (geralmente de menor intensidade que a amida I) com a absorção de uma dupla ligação aromática pois a absorção é mais intensa que seria de esperar se fosse devida a um ou outro grupo separadamente. Isto é particularmente importante pois parece mostrar que houve aromatização na reacção. Aliás, a pequena banda a NDO acima de 3000cm⁻¹ (não identificada) sugere a presença de ligações C-H aromáticas. A restante região do espectro (região *fingerprint*) possui múltiplos picos sobrepostos e é totalmente diferente das *fingerprint* das moléculas precursoras. Destaca-se a existência de um pico que pode ser atribuído a ácidos carboxílicos, epóxidos e éteres a 1288cm⁻¹ e a possível existência de aminas aromáticas a 1186cm⁻¹, não existentes nos precursores e que serão resultado da reacção hidrotérmica. Nesta região existem, aparentemente, contribuições de muitos grupos funcionais distintos das CNPs o que torna a análise extremamente difícil; os picos existentes foram imputados às respectivas ligações mais prováveis, no entanto, a probabilidade de erro na atribuição é considerável.

A presença de grupos funcionais carregados é necessária para a solubilidade das CNPs. Tanto o ácido cítrico como a etilenodiamina são solúveis devido aos seus grupos funcionais polares (ácidos carboxílicos, álcoois e aminas primárias) e portanto é natural que a solubilidade das NPs se deva também a grupos funcionais polares na sua superfície. Neste aspecto esta análise faz todo o sentido na medida em que é demonstrada a presença inequívoca de amidas e ácidos carboxílicos.

Tabela III.18 – Atribuição de picos a CNPs CL.

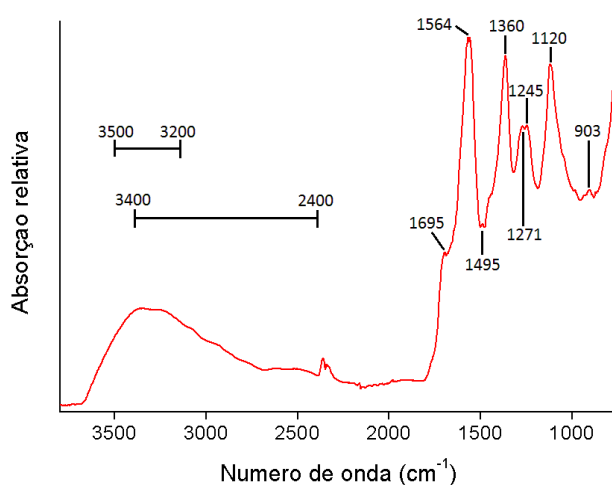


Figura III.52 – Espectro FTIR de CNPs CL.

Absorção (cm ⁻¹)	Ligação	Modo de vibração	Grupos funcionais
903	C-H C-H	Deformação Deformação	Alcano Aromático
1120	C-O C-O-C	Estiramento Estiramento	Álcool Éter
1245	C-O-C C-O-C C-N C-O C-O	Estiramento Estiramento Estiramento Estiramento Estiramento	Éter Éster Amina Epóxido Ácido carb.
1271	C-O-C C-O-C C-N C-O C-O	Estiramento Estiramento Estiramento Estiramento Estiramento	Éter Éster. Amina Epóxido Ácido carb.
1360	C-H	Deformação	Alcano
1495	C=C	Estiramento	Aromático
1564	C=C N-H	Estiramento Deformação	Aromático Amina
1695	C=O C=O	Estiramento Estiramento	Cetona Ácido carb.
[3400-2400]	O-H	Estiramento	Ácido carb.
[3500-3200]	O-H O-H	Estiramento Estiramento	Álcool Água

A composição química das cascas de laranja abrange um grande número de moléculas diferentes. Os principais responsáveis pela massa das cascas (com exceção da água) são hidratos de carbono, nomeadamente a celulose e derivados, açúcares etc. No entanto também existem outras moléculas na composição das cascas tais como proteínas e ácidos gordos. Devido à grande quantidade de moléculas diferentes que compõem as cascas de laranja, a atribuição de ligações específicas a picos do espectro FTIR das CNPs CL (figura III.52) é bastante complicada de efectuar com exactidão. A região *fingerprint* é a que coloca maior desafio na identificação. Por esse motivo, aos picos são atribuídas múltiplas ligações possíveis. No fundo é muito provável que estas mesmas ligações existam e que as contribuições das respectivas absorções se sobreponham no espectro.

É notória a presença de grupos funcionais polares como álcoois e ácidos carboxílicos. Estes deverão ser os principais responsáveis pela solubilidade destas CNPs em água. A banda geralmente atribuída a álcoois (3500-3200cm⁻¹) está presente mas sobreposta com a da água (dada a

possibilidade de o liofilizado absorver água da atmosfera por ser higroscópico). Ácidos carboxílicos também estarão presentes, evidenciados pela sua larga banda de absorção característica. Esta banda, não sendo tão visível como no caso dos CNPs AC E, não deixa de aparecer, bem com um ombro a 1695cm^{-1} . Este ombro encontra-se na região de absorção típica de ligações $\text{C}=\text{O}$ de ácidos carboxílicos mas também pode ser atribuído a cetonas. É importante constatar a existência de picos correspondentes a grupos aromáticos. Um destes, a 1564 cm^{-1} , é particularmente intenso (a contribuição de aminas deverá ser marginal). A aromatização pode ter ocorrido durante o tratamento térmico das cascas e é possível que existam estruturas aromáticas em abundância nestas CNPs.

Tabela III.19 – Atribuição de picos a CNPs 180.

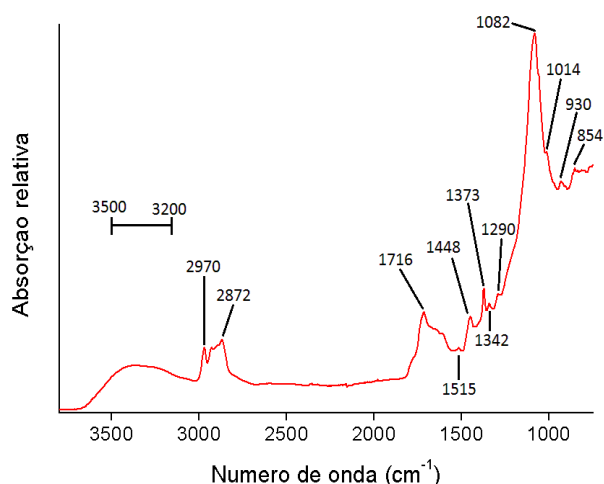


Figura III.53 – Espectro FTIR de CNPs 180.

Absorção (cm^{-1})	Ligação	Modo de vibração	Grupo funcionais
854	C-H	Deformação	Alifático
	C-H	Deformação	Aromático
930	C-H	Deformação	Alceno
1014	C-O	Estiramento	Álcool
1082	C-O	Estiramento	Álcool
	C-O-C	Estiramento	Éter
1290	C-O-C	Estiramento	Éster
	C-O	Estiramento	Ácido carb.
1342	O-H	Deformação	Álcool
	C-H	Deformação	Alifático
1373	O-H	Deformação	Álcool
	C-H	Deformação	Alifático
1448	O-H	Deformação	Ácido carb.
	C-H	Deformação	Alifático
1515	C=C	Estiramento	Aromático
1716	C=O	Estiramento	Ácido carb.
	C=O	Estiramento	Cetona
2872	C-H	Estiramento	Alifático
2970	C-H	Estiramento	Alifático
[3500-3200]	O-H	Estiramento	Álcool
	O-H	Estiramento	Água

O espectro FTIR das CNPs 180 (figura III.53) acusa a presença de grupos funcionais típicos das principais macromoléculas que compõe a cortiça: a suberina e lignina (ver tabela B.1 e figuras B.2 e B.3 do apêndice B). Por existirem muitas ligações diferentes existem também muitas sobreposições, especialmente na região *fingerprint*, tal como no caso anterior, dificilmente se pode atribuir uma ligação específica a cada pico.

A 1716cm^{-1} aparece o pico característico da ligação $\text{C}=\text{O}$ dos ácidos carboxílicos. Os picos destes carbonilos são geralmente muito intensos mas neste caso surge bastante reduzido, o que pode sugerir a presença de poucos ácidos carboxílicos. A banda O-H característica dos ácidos carboxílicos ($3400\text{-}2400\text{cm}^{-1}$) também não é visível (talvez mascarada pela linha de base irregular) o que reforça a sugestão anterior. O pico associado a carbonilos também pode ser atribuído a cetonas. Observa-se um ombro, à esquerda do pico a 1716cm^{-1} , que se encontra na região de absorção de carbonilos em ésteres. Note-se que também existe uma banda de absorção à direita deste pico.

Possivelmente, aqui a absorção dever-se-á a grupos aromáticos e alkenos. Não é provável que esta banda seja resultado da absorção de amidas visto que a presença de grupos nitrogenados na constituição da cortiça ser bastante reduzida (ver tabela B.1 no apêndice B).

A 1082cm^{-1} encontra-se o pico mais intenso da amostra. O pico pode ser atribuído a dois grupos distintos: álcoois e éteres. Relativamente as ésteres a absorção deveria ocorrer a NDOs ligeiramente maiores. De facto, parece existir um ombro à esquerda deste pico que indica a sobreposição de absorções de álcoois, éteres e ésteres. A solubilidade das CNPs deverá estar a cargo destes grupos³ e de ácidos carboxílicos. Entre os 3500 e 3200cm^{-1} temos uma larga banda que é característica das ligações O-H de álcoois e água. É expectável que a banda seja a contribuição das absorções dos dois grupos.

Grupos alifáticos (alcanos e alkenos) também são evidentes pela presença dos picos a 2872 e 2970cm^{-1} . Entre estes valores também se verificam regiões de absorção que devem ser derivadas destes grupos. O espectro FTIR parece indicar a presença dos principais grupos funcionais que fazem parte da constituição da cortiça. Provavelmente a temperatura de síntese não degradou significativamente estes grupos. A análise ^1H -RMN feita em III.2.3.2 corrobora esta análise FTIR.

Tabela III.20 – Atribuição de picos a CNPs 260.

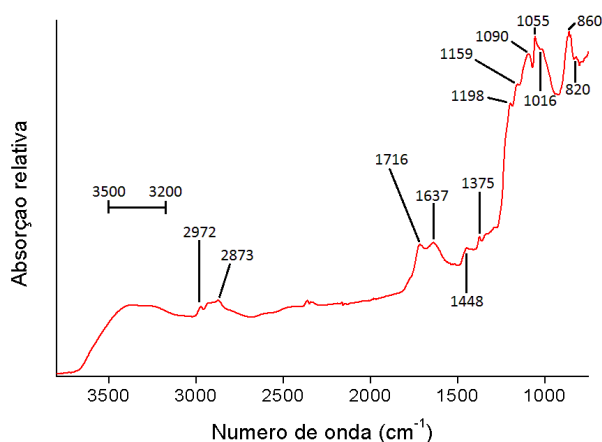


Figura III.54 – Espectro FTIR de CNPs 260.

Absorção (cm^{-1})	Ligação	Modo de vibração	Grupos funcionais
820	C-H	Deformação	Alifático
	C-H	Deformação	Aromático
860	C-H	Deformação	Alifático
1016	C-O	Estiramento	Álcool
1055	C-O	Estiramento	Álcool
	C-O-C	Estiramento	Éter
1090	C-O	Estiramento	Álcool
	C-O-C	Estiramento	Éter
1159	C-O	Estiramento	Álcool
	C-O-C	Estiramento	Éter
1198	C-O-C	Estiramento	Éter
	C-O	Estiramento	Ácido carb.
1375	O-H	Deformação	Álcool
	C-H	Deformação	Alifático
1448	O-H	Deformação	Ácido carb.
	C-H	Deformação	Alifático
1637	C=C	Estiramento	Aromático
1716	C=O	Estiramento	Ácido carb.
	C=O	Estiramento	Cetona
2873	C-H	Estiramento	Alifático
2972	C-H	Estiramento	Alifático
[3500-3200]	O-H	Estiramento	Álcool
	O-H	Estiramento	Água

³ No entanto ésteres em cadeias alifáticas longas reduzem solubilidade. Os principais polímeros da cortiça, que são completamente insolúveis em água, são constituídos por cadeias deste género.

O sinal do espectro FTIR das CNPs 260 (figura III.54) é pior que o obtido para as CNPs 180 (figura III.53) devido ao efeito crescente da linha de base mas as absorções presentes dever-se-ão a ligações semelhantes. Consequentemente, análise FTIR para as CNPs 260 é semelhante (comparar tabela III.20 com tabela III.19).

O espectro parece demonstrar a presença de grupos alifáticos e aromáticos. Face à banda de absorção na amostra de CNPs 180 situada na gama entre 1500 e 1700cm^{-1} , aparece um pico a 1637cm^{-1} mais intenso. Este pico deverá ser originado pela absorção de estruturas aromáticas. Tendo em conta a temperatura de carbonização superior, faz todo o sentido que as ligações mais susceptíveis como alcenos e ésteres tenham sido quebradas, que compostos alifáticos tenham volatilizado e que tenham ocorrido reacções de aromatização durante a reacção.

Parecem também evidentes as absorções por parte de ligações C-O de álcoois e C-O-C de éteres, ligações essas que, aparentemente, também presentes nas CNPs 180. As contribuições de ésteres deverão ser marginais.

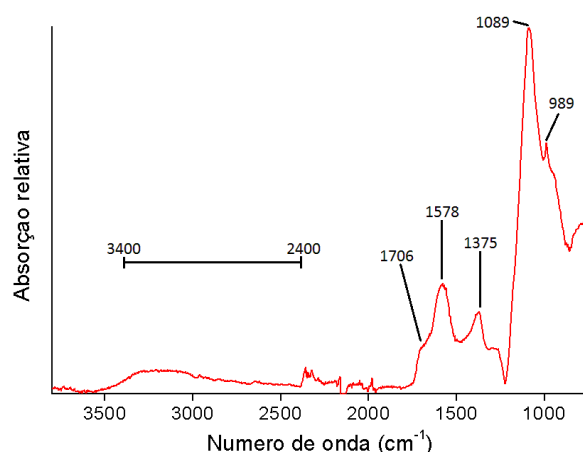


Figura III.55 – Espectro FTIR de CNPs 300.

Tabela III.21– Atribuição de picos a CNPs 300.

Absorção (cm^{-1})	Ligação	Modo de vibração	Grupos funcionais
989	C-H	Deformação	Alifático
1089	C-O	Estiramento	Álcool
	C-O-C	Estiramento	Éter
	C-O	Estiramento	Ácido carb.
1375	C-H	Deformação	Alifático
	O-H	Deformação	Álcool
1578	C=C	Estiramento	Alceno
	C=C	Estiramento	Aromático
1706	C=O	Estiramento	Ácido carb.
[3400-2400]	O-H	Estiramento	Ácido carb.

No espectro FTIR das CNPs 300 (figura III.55) subsistem poucos picos de absorção no IV. O pico mais intenso, a 1089cm^{-1} , pode ser atribuído a álcoois, éteres e ácidos carboxílicos. Este pico é consideravelmente largo e pressupõe a sobreposição da absorção destes grupos funcionais. A vibração C-O de ácidos carboxílicos costuma dar-se a NDOs maiores. No entanto não é invulgar a ligação C-O de ácidos carboxílicos absorver a menores NDOs (ver figura A.7 no apêndice A). A banda referente à ligação O-H dos ácidos carboxílicos, entre 3400 e 2400cm^{-1} , e o ombro localizado a 1706cm^{-1} (ligação C=O) evidenciam a presença deste grupo funcional, embora as intensidades dos sinais referentes a estas absorções sejam fracas. Estes grupos funcionais também parecem estar presentes nas amostras de CNPs 180 e CNPs 260. Não são detectados ésteres. Não é provável que estas ligações tenham resistido ao tratamento térmico. Verifica-se ainda o desaparecimento das absorções a NDOs logo abaixo dos 3000cm^{-1} respectivas a estiramentos de ligações C-H alifáticas. Tal é sugestivo da volatilização de compostos alifáticos durante o tratamento térmico.

No espectro FTIR não se visualiza a presença de estiramentos associados a ligações O-H, geralmente definidos na banda entre os 3500 e 3200cm^{-1} , o que leva a considerar que o pico a 1089cm^{-1} se deve a vibrações de éteres e ácidos carboxílicos e que o pico 1375cm^{-1} se deva fundamentalmente a deformações em ligações C-H alifáticas. Em relação à presença de grupos

funcionais oxigenados, a análise FTIR demonstra a existência destes mas eram esperados picos de C=O mais intensos e o aparecimento da banda de absorção de ligações O-H. No fundo álcoois e ácidos carboxílicos deveriam ser os principais responsáveis pela solubilidade em meio aquoso.

Como estas CNPs foram sintetizadas à temperatura mais elevada são esperados mais grupos funcionais aromáticos que nas outras amostras de CNPs de cortiça carbonizada. Com efeito, a 1578cm^{-1} existe um pico que é atribuído, essencialmente a grupos aromáticos. Contribuições de ligações C=C de alcenos devem ser negligenciáveis. Seguindo o raciocínio da análise anterior, esta amostra de CNPs obtida a partir de cortiça carbonizada, é aquela onde houve maior volatilização de compostos alifáticos e maior número de aromatizações. De facto, a absorção nestas regiões de grupos aromáticos parece intensificar-se com o aumento da temperatura de síntese. Este raciocínio tem cabimento na análise feita por ^1H -RMN, feita a seguir.

III.2.3.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão

Foram caracterizadas por ^1H -RMN todas as amostras de CNPs obtidas por carbonização da cortiça. Os espectros de ^1H -RMN permitem estabelecer que com o aumento de temperatura existe diminuição no número de compostos alifáticos nas CNPs concomitantemente com o aumento do número de compostos aromáticos.

As CNPs que foram liofilizadas para determinação de rendimentos de reacção foram dispersas em água deuterada, D_2O , usada como solvente. A D_2O não é 100% pura e contém vestígios de DHO e água. Adicionalmente as amostras são higroscópicas e podem ter absorvido alguma água. Além disso, a liofilização nunca remove totalmente a água das amostras. Por estes motivos nos espectros ^1H -RMN observa-se um pico muito intenso a 4,71ppm correspondente ao desvio químico da água e DHO. De facto este pico é dominante em todos os espectros e efectivamente, indicia uma predominância de protões da molécula de água. Isto traduz-se numa diminuição do sinal da amostra. As regiões dos desvios químicos dos protões foram identificados atendendo a [68].

O espectro ^1H -RMN adquirido para as CNPs 300 tinha muito pouco sinal e, por esse motivo, não é apresentado. As amostras de CNPs 220 e CNPs 260 estão, muito provavelmente, contaminadas com outro solvente utilizado anteriormente. A contaminação é evidenciada pelas duas regiões mais proeminentes destes espectros: um quarteto centrado a 3,58ppm e um tripleto centrado a 1,10ppm. A contaminação pode ter sido provocada por restos de etanol ou éter etílico [69].

No espectro de protão das CNPs 180 (figura III.56) temos a presença de grupos alifáticos evidenciados pela ressonância de protões em grupos alquilo (R-CH_3 , $\text{R}_1\text{-CH}_2\text{-R}_2$ e $\text{R}_1\text{-CH-R}_2\text{R}_3$). Os desvios químicos destes grupos encontram-se na região entre 1,08 e 4,09ppm. O pico dominante, centrado a 1,09ppm e os dois picos a 1,19 e 1,26ppm são relativos a hidrocarbonetos saturados. Os desvios químicos entre 1,87 e 4,09ppm são relativos à ressonância de protões de grupos alquilo em éteres, grupos metóxido, álcoois e grupos alquilo ligados a grupos com ligações duplas de alcenos ou de carbonilos. Os carbonilos podem ser de ésteres e de derivados de ácidos carboxílicos. Observe-se a região entre 3,2 e 3,8ppm, indicadora de múltiplos picos sobrepostos e impossíveis de identificar com clareza.

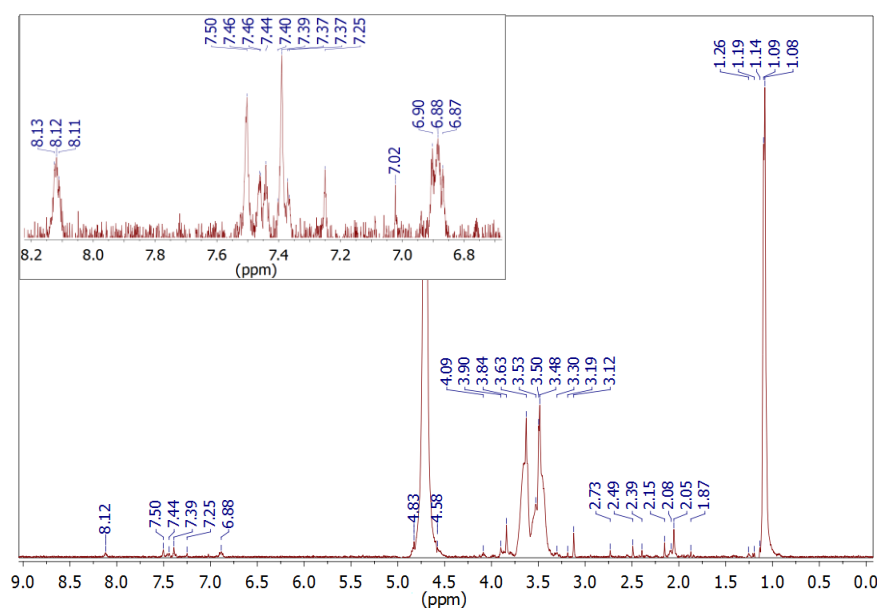


Figura III.56 – Espectro ^1H -RMN de CNPs 180. O *inset* exibe a região aromática ampliada.

Entre 6,87 e 8,13ppm temos uma região de picos correspondentes a desvios químicos associados a prótons em grupos aromáticos (*inset* da figura III.56).

Hidrocarbonetos saturados, alcenos, éteres, ésteres, álcoois e grupos aromáticos são abundantes nas principais estruturas que compõem a cortiça, suberina e lignina (ver figuras B.2 e B.3 do apêndice B), e como a temperatura de síntese é relativamente baixa não é expectável que exista uma intensa degradação destes polímeros, nomeadamente em ligações duplas. Neste aspecto a análise ^1H -RMN está de acordo com a feita em FTIR.

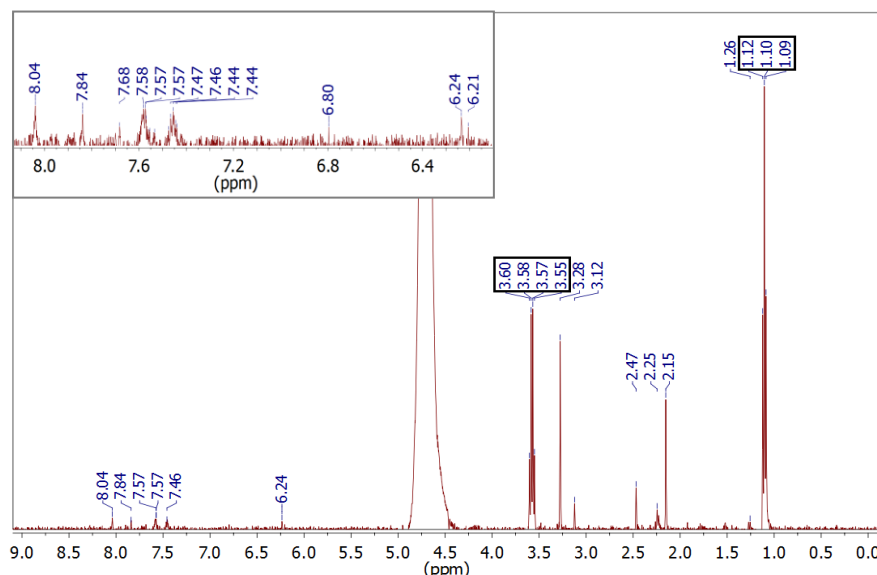


Figura III.57 – Espectro ^1H -RMN de CNPs 220. O *inset* exibe a região aromática ampliada.

No espectro de próton das CNPs 220 também temos a presença de grupos funcionais alifáticos ligados a grupos alquila (figura III.57). Neste caso a contaminação pode provocar perda de sinais significativos pois é possível que estejam sobrepostos com os desvios químicos do CH_3 tripleto e do CH_2 quarteto do etanol ou do éter etílico.

Os grupos alifáticos são exibidos numa gama de desvios químicos entre 1,26 e 3,28ppm. A presença de hidrocarbonetos saturados é denunciada pelo pico a 1,26ppm. Não é possível investigar a degradação de hidrocarbonetos com o tratamento térmico devido à contaminação. Os picos entre 2,15 e 3,28ppm são relativos éteres, álcoois e derivados de ácidos carboxílicos. A grande diminuição de sinal nesta região pode ser atribuída a degradação ocorrida durante a reacção (designadamente a volatilização de grupos alifáticos). Os grupos com ligações duplas, tais como ésteres e alcenos oxidam facilmente com oxigénio molecular a temperaturas elevadas. Apesar de existirem menos picos, observa-se o aumento de sinal nos desvios químicos entre 2,15 e 3,28ppm. Isto pressupõe a diminuição de ligações mais reactivas e o possível aumento de grupos oxidados no material.

Os prótons ligados a grupos aromáticos também estão presentes no espectro na região entre 6,21 a 8,04ppm (*inset* da figura III.57). Relativamente às CNPs 180 estes grupos serão, porventura, mais numerosos mas como o sinal neste espectro é mais fraco que o do anterior não se pode confirmar esta suposição. Efectivamente, com temperatura de síntese mais elevada, são esperadas mais reacções de aromatização [70].

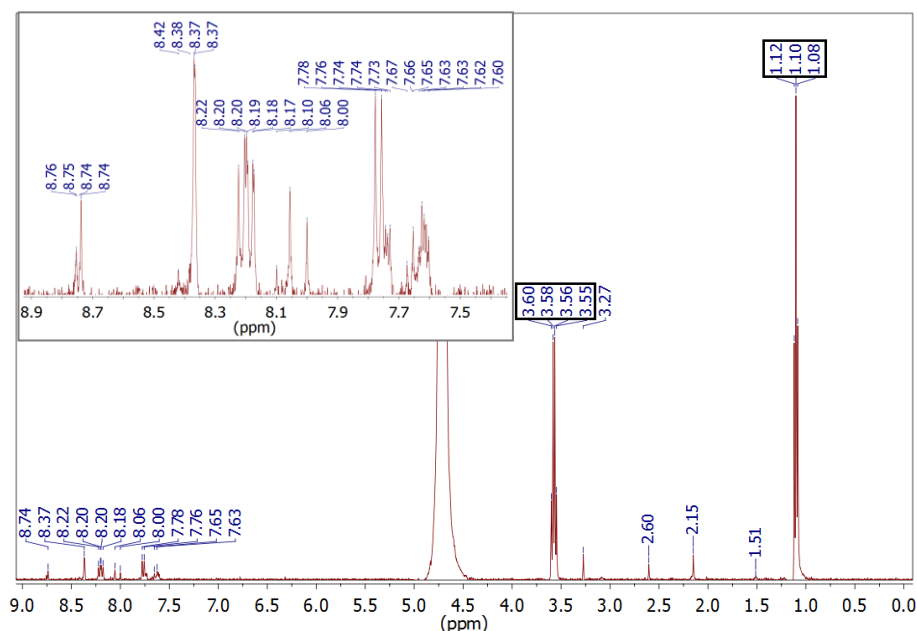


Figura III.58 - Espectro ¹H-RMN de CNPs 260. Em *inset* é exibida a região aromática ampliada.

No espectro ¹H-RMN CNPs 260 (figura III.58) verifica-se a mesma contaminação com solvente observada no espectro anterior. Os grupos alifáticos encontram-se entre 1,51 e 3,27ppm, com os hidrocarbonetos a serem identificados pelo pico a 1,51ppm. Os picos a 2,15ppm, 2,60ppm e 3,27ppm são referentes a éteres, álcoois e derivados de ácidos carboxílicos. Ésteres e alcenos já não deverão estar presentes. Existe uma clara diminuição no número de grupos alifáticos face a ambos casos anteriores.

No que toca aos grupos aromáticos, verifica-se um aumento de intensidade de sinal na respectiva região (7,60 a 8,76ppm) relativamente aos dois casos anteriores, bem como um nítido deslocamento para desvios químicos maiores (ver *inset* da figura III.58). Esse deslocamento pode ser evidência de conjugação de grupos aromáticos. Neste ponto, a análise por espectroscopia de próton e por FTIR validam-se mutuamente.

III.2.3.3 Potencial Zeta

O potencial ζ revela os efeitos práticos da composição estrutural na superfície das NPs. Foram feitas três medições independentes de potencial ζ para a amostra de CNPs 300 sem diluição. O valor médio de potencial ζ para as CNPs 300 é de $-25,7 \pm 1,2$ mV. Não se obteve sinal para as CNPs PVP e CNPs CL. As restantes amostras não exibiam sinal de DLS e, por isso, não fazia sentido testá-las.

As medições de potencial ζ ($> |25$ mV) para estas NPs demonstram a sua propensão à estabilidade coloidal em meio aquoso. Potenciais negativos estão em concordância com os grupos funcionais oxigenados na superfície esperados para estas CNPs. Grupos funcionais oxigenados como álcoois, ácidos carboxílicos e derivados, e éteres são electronegativos e é a sua presença na superfície das CNPs que gera o potencial de superfície negativo medido com esta técnica. Esta carga negativa torna as CNPs solúveis em meio aquoso e previne a agregação por repulsão electrostática. Além disso, prevê a eficácia de internalização celular, visto que NPs com grupos funcionais de superfície carregados favorecem interações electrostáticas com as membranas celulares [71].

III.3 Marcações celulares

A marcação celular foi feita em linhas celulares Saos-2 e HFFF2 usando todos os tipos de CNPs. As concentrações usadas para marcação com CNPs armazenadas a seco (ver subcapítulo II.3.4) estão numa gama considerada adequada para manter boa viabilidade celular [21] [30] [41] [72]. As alíquotas usadas na marcação com CNPs armazenadas em solução (ver subcapítulo II.3.4) são superiores às mencionadas em [32] e [73] e eram desconhecidas as consequências que a diminuição da concentração dos constituintes do meio teria na viabilidade celular mas, aparentemente, a diluição do meio de cultura não prejudicou a viabilidade em ambas as linhas celulares. As concentrações de CNPs armazenadas em solução usadas para a marcação são consideravelmente inferiores às concentrações usadas para marcação com amostras de CNPs armazenadas a seco.

III.3.1 Linhas celulares Saos-2

Foram semeados 20 poços da placa com 15000 células em cada poço. Em 18 poços as células foram incubadas com CNPs nas circunstâncias referidas no subcapítulo II.3.4. Os restantes dois poços serviram como controlos. A marcação de osteoblastos foi bem-sucedida com as CNPs AC E em apenas 6h de incubação com CNPs. As imagens da marcação fluorescente em ambas as concentrações usadas não revelaram nenhuma diferença significativa, quer ao nível da intensidade da fluorescência das NPs internalizadas, quer ao nível da morfologia exibida pelas células. Os restantes tipos de CNPs não foram eficazes na marcação destas células. Apresentam-se seguidamente as imagens de fluorescência com emissão azul e verde (excitação no UV próximo, 340-380nm, e azul 465-485nm, respectivamente).

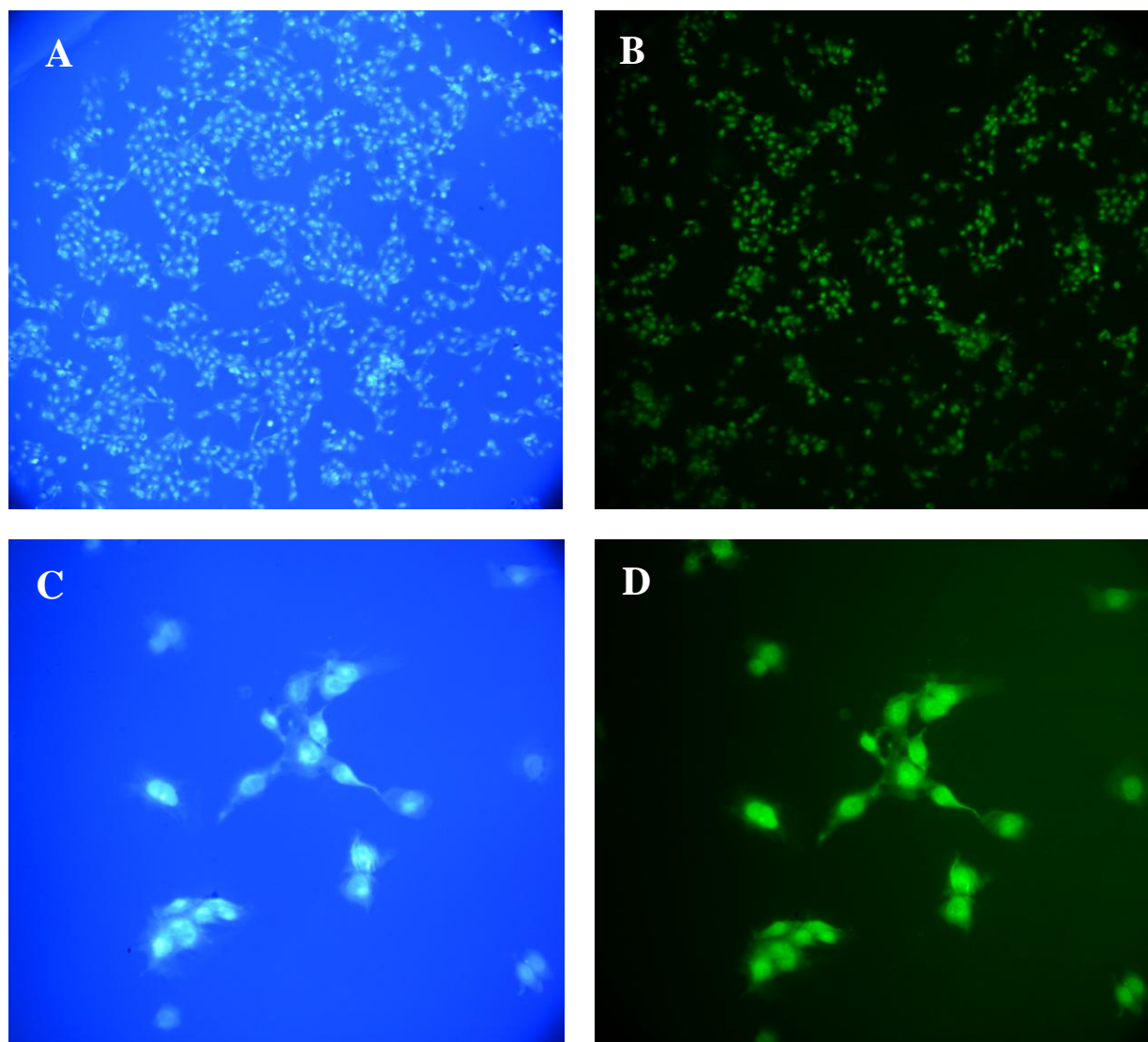


Figura III.59 – Imagens de microscopia de epifluorescência de células Saos-2 marcadas com CNPs AC E (concentração de CNPs em meio de incubação: 1mg/ml). As imagens A e C foram obtidas com luz excitatória no UV próximo e as imagens B e D com luz azul. Ampliação: A e B de 100× e C e D de 400×. As imagens foram adquiridas com tempos de exposição de 1s.

A visualização das imagens da figura III.59 permite constatar que estas CNPs foram internalizadas com sucesso e que emitem fortemente a partir do meio intracelular com excitação no UV próximo e azul. De acordo com os espectros de emissão adquiridos (ver figura III.12) e o elevado FQY destas CNPs (ver tabela III.5), é esperada forte fluorescência azul e forte fluorescência verde (embora com cerca de metade da intensidade da emissão azul). Note-se que o contraste nas imagens B e D da figura III.59 é muito superior ao das imagens A e C da figura III.59, por isso a fluorescência nestas imagens aparenta maior intensidade. Tal deve-se a um fundo de fluorescência muito intenso nas imagens A e C da figura III.59. A origem da fluorescência de fundo pode residir predominantemente noutras moléculas fluorescentes que fazem parte da constituição dos meios de cultura celular, como a riboflavina, que aderem às lamelas de vidro e não são devidamente removidas pela lavagem com PBS e aparentam ser particularmente emissivas quando excitadas no UV próximo.

As imagens de microscopia de fluorescência A e B da figura III.59 permitem verificar que houve uma internalização bastante homogênea por parte dos osteoblastos. As imagens C e D da figura III.59 permitem averiguar que as CNPs se localizam preferencialmente na membrana nuclear e no interior do núcleo. Esta afinidade pelo núcleo dos osteoblastos deverá ser consequência da estrutura química da superfície destas CNPs. Esta marcação é indiciadora de especificidade das CNPs AC E na marcação deste organelo neste tipo de células. Também é visível a emissão de fluorescência proveniente do citoplasma, embora com muito menor intensidade.

Para garantir que a fluorescência exibida pelas células é proveniente de NPs e não da própria célula (autofluorescência) foi feito um controlo com imagens de células incubadas sem CNPs. O controlo efectuado assegura que a fluorescência observada é fruto da internalização celular de CNPs AC E (ver figura E.2 do apêndice E).

III.3.2 Linhas celulares HFFF2

Tendo sido demonstrada a eficácia da marcação com CNPs AC E em linhas celulares Saos-2 optou-se por trabalhar com linhas celulares HFFF2 pois o meio de cultura usado para a linha Saos-2 (meio de cultura McCoy's 5A) contém vermelho de fenol que, por ser uma molécula fluorescente, pode contribuir para a fluorescência de fundo. No entanto não foi detectado nenhum decréscimo na fluorescência de fundo ao usar meio de cultura DMEM sem vermelho de fenol.

A abordagem experimental para marcação dos fibroblastos com CNPs foi análoga à usada para marcar os osteoblastos. Foram semeadas cerca de 10000 células por poço e foram usadas as mesmas concentrações de CNPs com o mesmo de tempo de incubação em meio com NPs. No entanto, ao fim das 6h de incubação não foi detectada internalização celular por nenhuma das CNPs visto que em nenhuma das lamelas era visível fluorescência diferente da fluorescência intrínseca dos fibroblastos (ver figura E.4 do apêndice E). Perante este resultado, apostou-se na marcação da linha HFFF2 com períodos de incubação maiores com toda a gama de CNPs disponíveis, para investigar se a variável tempo de incubação teria alguma influência no sucesso da marcação. Foram estipulados tempos para incubação de 12h, 24h e 48h. As concentrações e alíquotas de CNPs em meio foram mantidas.

No segundo ensaio com esta linha celular foram semeadas aproximadamente 15000 células por poço e o tempo de incubação foi de 10h. Não foi detectada fluorescência emitida por CNPs em meio intracelular.

Nos dois ensaios seguintes foram semeadas cerca de 10500 células por poço. O tempo de incubação com CNPs no terceiro ensaio rondou as 24h inicialmente previstas. Neste ensaio foi verificada uma marcação eficaz com as CNPs AC E e CNPs CL para as duas concentrações usadas. As células incubadas com outros tipos de CNPs não exibiram sinais de internalização de NPs uma vez que não foi observada fluorescência de CNPs no meio intracelular.

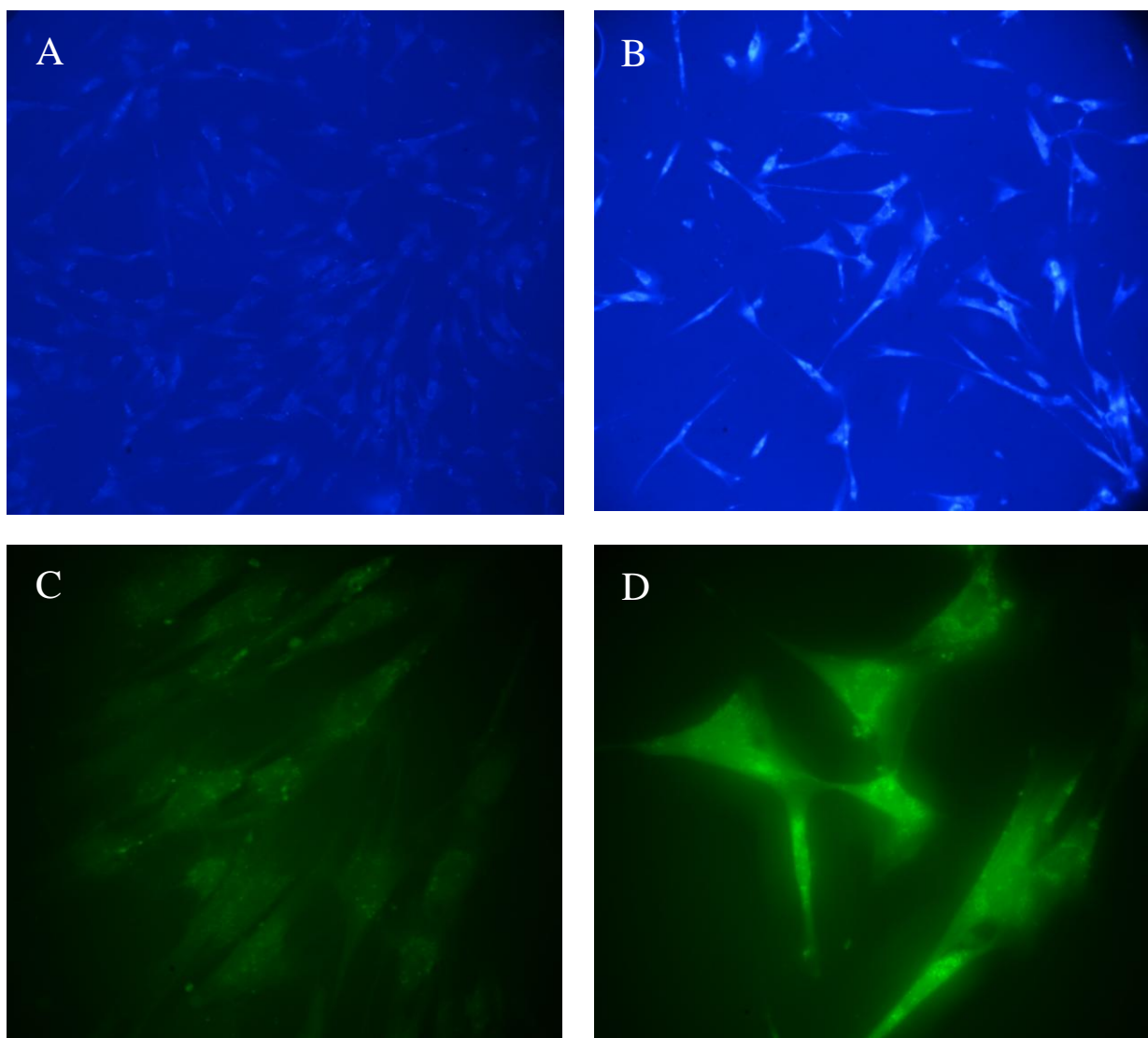


Figura III.60 – Imagens de microscopia de epifluorescência de fibroblastos marcados com CNPs AC E com tempos de incubação de 24h. CNPs internalizadas a concentrações de 0,5mg/ml (A) e 1mg/ml (B) com excitação no UV próximo e ampliação de 100×. CNPs internalizadas a concentrações de 0,5mg/ml (C) e 1mg/ml (D) com excitação no azul e ampliação de 400×. As imagens foram adquiridas com exposição de 1s.

A partir das imagens da figura III.60 verifica-se que a fluorescência é bastante mais intensa nas células que incubaram durante 24h na solução de meio com concentração em CNPs de 1mg/ml (figura III.60 B e D). Esta observação é generalizada para todas as imagens obtidas com os diferentes filtros de excitação e a diferentes ampliações. Aparentemente as CNPs parecem localizar-se no citoplasma.

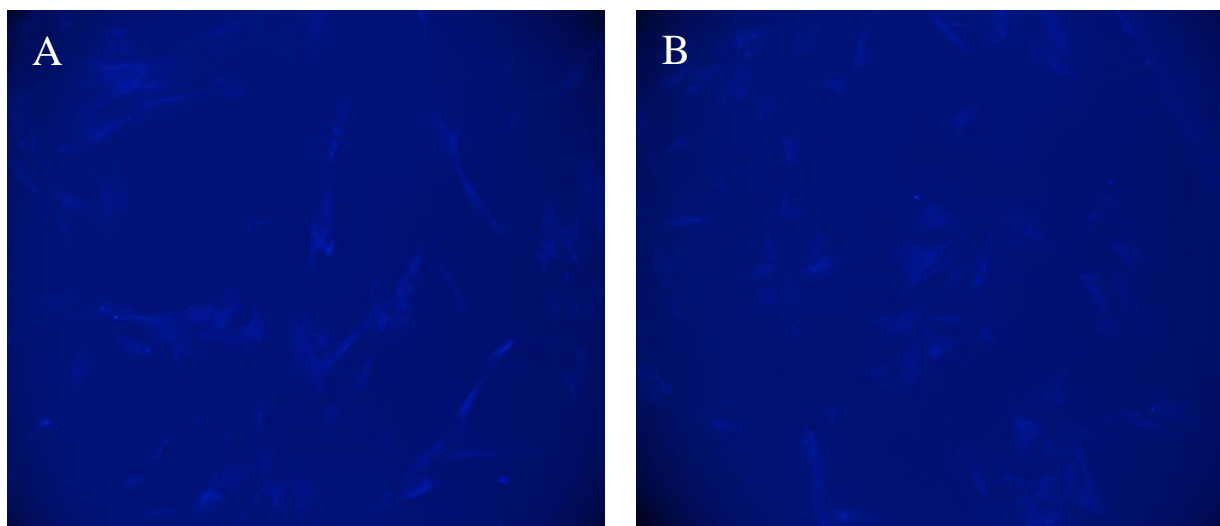


Figura III.61 – Imagens de microscopia de epifluorescência de fibroblastos marcados com CNPs CL com tempos de incubação de 24h. CNPs internalizadas a concentrações de 0,5mg/ml (A) e 1mg/ml (B) com excitação no UV próximo e ampliação de 100×. As imagens foram adquiridas com tempos de exposição de 1s.

No caso das CNPs CL não se verifica nenhuma alteração visível ao nível da intensidade de fluorescência do meio intracelular com a concentração de NPs usada para marcação. A fluorescência nestes fibroblastos é fraca e fornece pouco detalhe ao nível da morfologia celular (figura III.61) mas, por comparação com o controlo de autofluorescência feito para os fibroblastos, a fluorescência celular deverá mesmo ser oriunda da internalização das CNPs CL (comparar com figura E.4 do apêndice E). Relativamente aos fibroblastos que internalizaram CNPs AC E (figura III.60, imagens A e B) a fluorescência é notoriamente mais fraca. Note-se que estas NPs possuem o FQY mais baixo (ver tabela III.6). Tal como no caso anterior, as NPs parecem situar-se preferencialmente no citoplasma. Não foi possível obter imagens com ampliação de 400× devido à dificuldade de focagem.

No quarto ensaio as 48h previstas para incubação com CNPs transformaram-se em 72h por indisponibilidade da câmara de cultura no dia antevisto. A marcação da linha celular HFFF2 foi bem-sucedida com as CNPs AC E, CNPs 180, CNPs 220 e CNPs 300. As restantes CNPs não marcaram esta linha celular. Apresentam-se seguidamente as imagens de microscopia de epifluorescência.

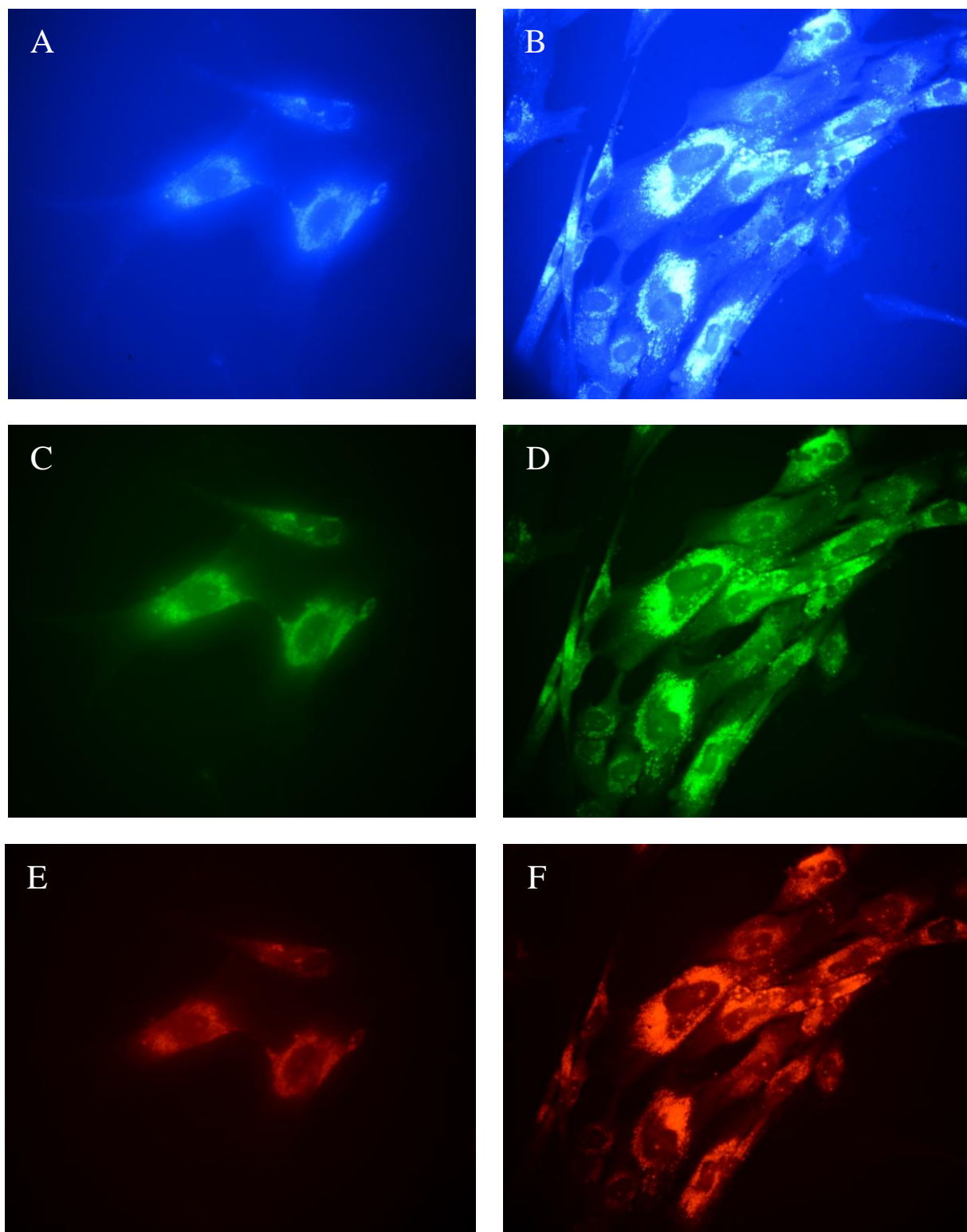


Figura III.62 – Imagens de microscopia de epifluorescência de fibroblastos marcados com CNPs AC E com tempos de incubação de 72h. CNPs internalizadas a concentrações de 0,5mg/ml (A, C e E) e 1mg/ml (B, D e F) com excitação no UV próximo (A e B) azul (C e D) e verde (E e F) – excitação no verde: 528 a 553nm. Ampliação de 400× em todas as imagens. Tempos de exposição na aquisição: 0,5s (A, C e E) e 1s (B, D e F).

À semelhança do que foi observado na figura III.60, na figura III.62 verifica-se que as células que incubaram em meio com maior concentração de CNPs AC E exibem fluorescência mais intensa (imagens B, D e F da figura III.62). Nestas células as CNPs situam-se no citoplasma, com preferência à volta do núcleo. Outra observação muito importante pode ser feita comparando as figuras III.60 e III.62: a maiores períodos de incubação com este tipo de NPs correspondem taxas de internalização mais elevadas. Apesar desta importante observação, para uma quantificação da internalização rigorosa seria necessário um estudo mais sistemático.

Tanto quanto foi possível apurar não existem registos de períodos de incubação com CNPs tão longos. Em contraste de fase as células em todos os poços cultivados possuíam uma morfologia normal (ver figura E.3 no apêndice E). Tal observação é indicadora da excelente biocompatibilidade apresentada por estas CNPs.

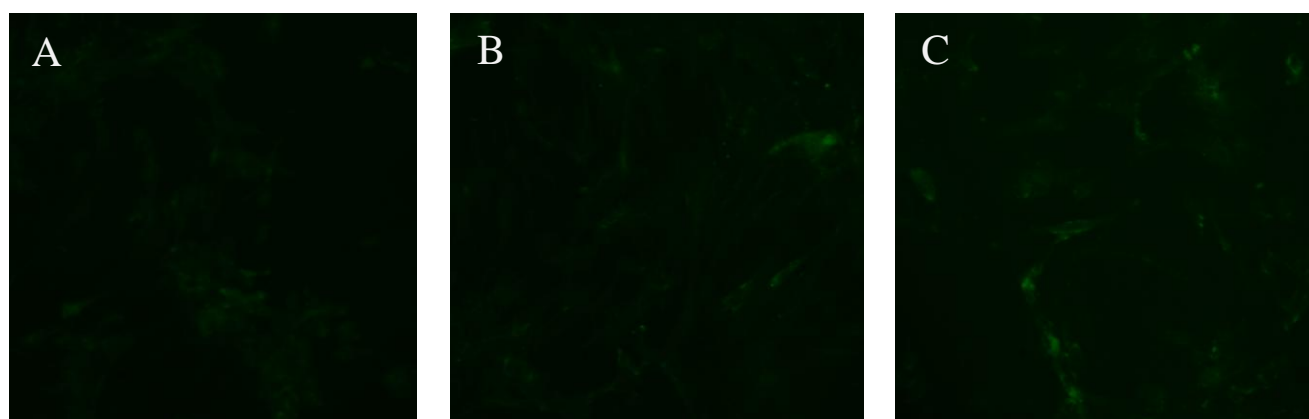


Figura III.63 – Imagens de microscopia de epifluorescência de fibroblastos marcados com CNPs 180 (A), CNPs 220 (B) e CNPs 300 (C). A alíquota usada em todas as marcações foi de 0,3 mL. Os espécimes foram excitados com luz azul. A magnificação usada é de 100×. Os tempos de exposição para adquirir as imagens foram de 3s (A e C) e 2s (B).

A fluorescência das células que foram marcadas com CNPs obtidas a partir da carbonização de cortiça (figura III.63) é muito ténue e não possibilita uma distinção adequada da morfologia das células e estruturas celulares. Comparativamente com o controlo de autofluorescência efectuado (figura E.4 do apêndice E) parece de facto existir fluorescência proveniente de NPs internalizadas mas tal internalização deverá ser muito reduzida. Aqui o principal factor responsável pela fraca fluorescência celular deverá ser a baixa concentração em CNPs dispersas no meio de incubação mas as intensidades emissivas das próprias CNPs que são relativamente baixas também não colaboram neste ponto (ver perfis de fluorescência das figuras III.16-17 e III.19 e ver tabela III.6).

Capítulo IV – Conclusões e perspectivas futuras

A produção e caracterização de nanopartículas de carbono fluorescentes é uma área em que a investigação está numa fase preliminar. Neste sentido, esta classe recente de nanomateriais fluorescentes é particularmente atractiva em investigação biomédica. Com este trabalho procurou-se não só estudar as propriedades de foro espectroscópico, morfológico e estrutural, como também validar a utilização de CNPs produzidas por métodos económicos e simples como marcadores celulares fluorescentes. Para o efeito foram caracterizadas nove amostras diferentes de CNPs produzidas através de dois métodos térmicos: síntese hidrotérmica e carbonização a seco em atmosfera ambiente. Para estudar a eficiência das CNPs em imagiologia celular, as diferentes amostras de CNPs foram usadas como marcadores celulares fluorescentes para visualização de células em MF.

As primeiras sínteses de CNPs foram realizadas usando procedimentos inspirados em referências da literatura e permitiram ganhar o *know-how* necessário para os métodos de produção e caracterização. Destas sínteses iniciais foram seleccionadas para uso futuro as quatro que exibiam propriedades espectroscópicas mais interessantes e que foram armazenadas a seco: CNPs PVP, CNPs AC E, CNPs G e CNPs CL.

Após a fase inicial decidiu-se produzir CNPs a partir de dois precursores que, tanto quanto se sabe, nunca foram utilizados em produção de CNPs: PAA, pelo método hidrotérmico, e cortiça, por carbonização simples. O estudo intencionado com CNPs a partir de PAA foi abandonado por pôr em causa a biocompatibilidade pretendida, tendo sido produzida apenas uma amostra cujas propriedades foram devidamente estudadas. Com a cortiça em grão foram feitas algumas sínteses iniciais para estabelecer o tempo de reacção necessário e seguidamente, com este tempo determinado, foram produzidas quatro amostras a temperaturas diferentes: 180°C, 220°C, 260°C e 300°C. Estas amostras de CNPs são fluorescentes e foram devidamente caracterizadas e empregues como marcadores para imagiologia celular por fluorescência.

A síntese hidrotérmica mostrou ser um método produtivo com maior rendimento aparente. A análise FTIR revela que as amostras obtidas por síntese hidrotérmica de macromoléculas (CNPs PVP, CNPs PAA e CNPs G) são na realidade constituídas maioritariamente pelo respectivo precursor molecular. Nas amostras de CNPs obtidas por carbonização simples também parecem existir restos de polímeros (visíveis em todas as imagens TEM adquiridas). Possivelmente o rendimento calculado que mais se aproxima de uma transformação efectiva de precursores moleculares em NPs é o das CNPs AC E, apesar da ligeira perda de material fluorescente verificada durante a diálise. Para evitar esta perda devia ter sido usada uma membrana com massa de corte inferior. Tendo estas considerações em conta, o método hidrotérmico parece ser o mais eficiente na produção de CNPs comparativamente com a carbonização a seco, embora seja difícil quantificar com precisão a taxa de transformação de precursor em NPs por ambos os métodos. Para tal seria necessário recorrer a um método para a separação eficiente entre NPs e fase polimérica. Deve-se realçar ainda o potencial observado da técnica *sparging* para soluções de CNPs com vista a aumentar a estabilidade e a prolongar o tempo de armazenamento das amostras em solução.

As propriedades espectroscópicas das CNPs produzidas enquadram-se no comportamento óptico característico destas NPs, com excepção das CNPs AC E. Observam-se perfis de absorção

intensos no UV, intensidade essa que decai com o aumento do CDO. Em relação aos espectros de fluorescência são verificados perfis de emissão largos e assimétricos em que se observa um deslocamento do máximo de emissão para o vermelho com o aumento do CDO de excitação. Esta dependência da emissão com o CDO de excitação é típica neste tipo de NPs. Neste ponto a amostra de CNPs AC E emerge como um caso singular na medida em parece existir fluorescência centrada a dois CDOs distintos quando a amostra é excitada a CDOs baixos. O máximo absoluto de emissão para esta amostra verificou-se aquando da excitação a 360nm. Para as restantes amostras de CNPs o máximo absoluto de emissão varia entre CDOs de excitação de 310 e 330nm. Com os espectros de excitação adquiridos foi possível fazer uma ligação entre a emissão a dado CDO e o CDO a que os cromóforos responsáveis por essa emissão absorvem. Verifica-se que nalgumas amostras a fluorescência das CNPs é resultado da excitação de diferentes cromóforos enquanto noutras são os mesmos cromóforos a contribuir para emissão a diferentes CDOs. No caso particular das CNPs AC E os espectros de excitação demonstram a presença de duas regiões de absorção distintas correspondentes à contribuição emissiva por parte de dois cromóforos distintos. Não foi apurado se os dois cromóforos diferentes correspondem a regiões emissivas totalmente distintas na superfície das NPs ou a CNPs de diferentes formas e/ou tamanhos. A imagem SEM obtida para estas CNPs não revela informação fiável para inferir quanto à legitimidade da segunda hipótese. A utilização de uma técnica de separação adequada poderia averiguar se esta hipótese é válida.

A medição dos FQYs permite constatar que as CNPs produzidas pelo método hidrotérmico são, em geral, mais emissivas com FQYs a variar entre 4 e 11%. Os FQYs mencionados na literatura para CNPs de gelatina, CNPs de PVP e CNPs de ácido cítrico e etilenodiamina são de 31,6%, 23,6% e 24,7% respectivamente. Comparativamente os FQYs medidos são mais baixos. Em relação às CNPs produzidas por carbonização a seco, os valores de FQY situam-se entre os 5 e 2%. Estes valores estão em maior concordância com a literatura (FQY de 7,1% para CNPs obtidos a partir de cascas de melancia carbonizadas).

No que diz respeito à morfologia, a maioria das CNPs produzidas apresenta uma simetria quase esférica, observável a partir das imagens SEM e TEM. No que toca a dimensões existe uma grande divergência. De modo genérico é possível dizer que as dimensões das CNPs produzidas se encontram numa gama de dimensões considerada normal para este tipo de NPs visto que a grande maioria dos tamanhos cai entre os 2 e os 150nm. Neste aspecto, a discordância entre os tamanhos medidos pelas imagens TEM e SEM dificulta a análise. As três medições feitas por DLS apontam para aqueles que devem ser os tamanhos correctos para as respectivas CNPs, e consolidam os tamanhos observados a partir de imagens TEM ou SEM. Embora não seja possível esclarecer devidamente qual dos métodos usados produz NPs de menores dimensões, a análise global dos dados adquiridos parece sugerir que com o método hidrotérmico se obtêm CNPs mais pequenas.

Em termos da organização estrutural dos átomos, todas as CNPs, com excepção das CNPs CL, possuem natureza amorfa. A estrutura das CNPs CL deverá ser fundamentalmente amorfa mas o difractograma obtido para estas NPs aponta para a existência de regiões em que os átomos possuem organização estrutural. Por isso esta amostra tem um carácter semi-cristalino.

No que toca à análise da estrutura química das CNPs, a análise FTIR das amostras de CNPs produzidas a partir de macromoléculas pelo método hidrotérmico revelou ligações químicas praticamente idênticas às dos precursores. Este facto parece acusar uma transformação ineficiente dos precursores em NPs. Embora também ser possa dar o caso de terem sido produzidas CNPs

poliméricas e, portanto, com estrutura química idêntica à do precursor, a formação de filmes finos nas imagens SEM e TEM fortalece a primeira suposição. Por sua vez a análise FTIR feita para as CNPs AC E deve fornecer exclusivamente informação referente às ligações químicas das CNPs. Em relação às CNPs obtidas por carbonização a seco a informação estrutural contida nos espectros FTIR também deverá ser respeitante às CNPs. De facto também existem lixos nestas amostras mas devido à degradação térmica é possível que estes lixos apresentem estruturas químicas semelhantes às das próprias CNPs. As análises FTIR e ^1H -RMN para as CNPs obtidas a partir de cortiça carbonizada apontam para a diminuição no número de grupos alifáticos e o crescimento do número de grupos aromáticos com o aumento da temperatura de carbonização. Adicionalmente por ^1H -RMN é possível deduzir a ocorrência de conjugação dos grupos aromáticos com o aumento da temperatura.

A análise estrutural feita para as CNPs AC E, CNPs CL e CNPs obtidas por carbonização de cortiça indicia a presença de grupos funcionais oxigenados e nitrogenados que são polares e por isso são responsáveis pela solubilidade destas CNPs em meio aquoso. Adicionalmente as medições de potencial ζ feitas para as CNPs 300 estabelecem uma carga à superfície negativa (-25,7mV), presumivelmente derivada de grupos oxigenados presentes na superfície, que aponta para a estabilidade coloidal destas NPs.

A fase final deste trabalho consistiu na aplicação das CNPs para marcação por fluorescência em linhas celulares. De todas as CNPs produzidas, as CNPs AC E foram as únicas que marcaram eficazmente as duas linhas celulares usadas: Saos-2 e HFFF2. A fluorescência exibida pelas NPs internalizadas é bastante intensa e permite a obtenção de imagens com excelente contraste. Foi ainda verificada uma dependência da internalização destas CNPs com o tempo de incubação nos fibroblastos. Aparentemente, a maiores tempos de incubação em meio com estas CNPs corresponde um maior número de NPs internalizadas. Apesar desta observação, é necessário um estudo mais sistemático para confirmar esta observação. Adicionalmente a dependência do contraste de imagem com a concentração de CNPs AC E nos fibroblastos parece verosímil mas os estudos feitos não são adequados para confirmar esta hipótese. Existem algumas publicações que referem estudos de viabilidade celular para diferentes concentrações de CNPs com períodos de incubação inferiores a 24h. No entanto, se para algumas linhas celulares a eficácia de internalização for dependente do tempo de incubação com NPs, como os resultados deste trabalho parecem sugerir, existe grande carência de estudos respeitantes à citotoxicidade para longos períodos de exposição. Estudos deste género também são de importância capital para testes *in vivo*. As amostras de CNPs CL, CNPs 180, CNPs 220 e CNPs 300 também parecem ter sido internalizadas mas o seu potencial para marcação não foi provado visto que as imagens de MF obtidas possuem fraca fluorescência proveniente das células e, portanto, fraco contraste. É de realçar que a incubação com CNPs em longos períodos de tempo (72h) parece não afectar significativamente as células e, de facto, a morfologia das células, após este período de tempo, não evidencia alterações visíveis, mesmo no caso das CNPs PAA, supostamente citotóxicas. Para confirmar esta aparente biocompatibilidade seria necessário a realização de testes de viabilidade celular. As amostras de CNPs PVP, CNPs PAA, CNPs G e CNPs 260 não marcaram nenhuma das linhas celulares usadas.

Em suma, o objectivo inicialmente proposto para este trabalho foi integralmente atingido com a amostra de CNPs AC E. As restantes amostras demonstraram que procedimentos de síntese simples têm capacidade para produzir CNPs. De facto, as restantes amostras possuem as propriedades típicas deste tipo de NPs. No entanto não foram capazes de marcar as linhas celulares usadas ou fizeram-no fracamente. O facto de ser possível produzir NPs solúveis em água por um

método térmico extremamente simples a partir de um material termicamente resistente e hidrofóbico, como a cortiça, revela a possibilidade de produção de CNPs a partir de, virtualmente, qualquer biomassa. Deve-se ainda referir que, se não forem aplicadas técnicas de separação eficazes entre pequenos resíduos poliméricos e as CNPs obtidas, a pureza das amostras fica comprometida bem como a correcta caracterização estrutural. Tendo em conta os procedimentos experimentais mencionados em muitas publicações, este deve ser um problema comum (embora nunca seja mencionado). Por este motivo os métodos *top-down* permanecem como estado de arte na síntese de CNPs.

Para que estas NPs sejam alternativas realistas aos fluoróforos comuns existe necessidade de estudos sistemáticos que investiguem mais aprofundadamente reacções envolvidas na síntese, os mecanismos de fluorescência das CNPs e também investigação para aplicações específicas. Para o futuro antevê-se:

- O aperfeiçoamento de métodos de síntese *bottom-up*;
- A realização de estudos sistemáticos relativos à citotoxicidade das CNPs em função do tempo de incubação e concentração;
- Estudos *in vitro* da importância das variáveis concentração e tempo de incubação na internalização;
- O desenvolvimento de CNPs funcionalizadas, por exemplo, com PEG ligado covalentemente a anticorpos, para marcação específica de estruturas celulares e biomoléculas *in vitro*;
- Marcação específica *in vitro* com congregação de sinais de diferentes CNPs;
- Compreensão do processo de internalização (validação da teoria de endocitose);
- Compreensão do mecanismo de fluorescência;
- Análises metódicas dos efeitos de carga de superfície e de tamanho das CNPs para a internalização celular;
- Realização de estudos *in vivo*;
- Desenvolvimento de biossensores de elevada sensibilidade;
- Desenvolvimento de outras aplicações (fotónica, etc.).

Referências bibliográficas

- [1] Y. Leng, *Materials Characterization: Introduction to Microscopic and Spectroscopic Methods*. Singapore: John Wiley & Sons, 2008, p. 337.
- [2] D. B. Murphy and M. W. Davidson, *Fundamentals Of Light Microscopy and Electronic Imaging*, Second Edi. WILEY-BLACKWELL, 2013, p. 538.
- [3] B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. WILEY-VCH, 2011, p. 381.
- [4] P. P. Mondal and A. Diaspro, *Fundamentals of Fluorescence Microscopy: Exploring Life With Light*. Springer, 2014, p. 218.
- [5] U. Kubitscheck, *Fluorescence Microscopy: From Principles to Biological Applications*. WILEY-BLACKWELL, 2013, p. 410.
- [6] O. S. Wolfbeis, *Fluorescence Methods and Applications: Spectroscopy, Imaging, and Probes*, vol. 1130, no. 1. Blackwell Publishing, 2008, p. 328.
- [7] M. J. Saxton and K. Jacobson, "Single-Particle Tracking : Applications to Membrane Dynamics," 1997.
- [8] M. S. T. Gonçalves, "Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes.," *Chem. Rev.*, vol. 109, no. 1, pp. 190–212, Jan. 2009.
- [9] J. Lippincott-Schwartz and G. H. Patterson, "Development and use of fluorescent protein markers in living cells.," *Science*, vol. 300, no. 5616, pp. 87–91, Apr. 2003.
- [10] G. Jung, Ed., *Fluorescent Proteins II: Application of Fluorescent Protein Technology*. Saarbrücken: Springer New York, 2012, p. 282.
- [11] M. J. Ruedas-Rama, J. D. Walters, A. Orte, and E. a H. Hall, "Fluorescent nanoparticles for intracellular sensing: a review.," *Anal. Chim. Acta*, vol. 751, pp. 1–23, Nov. 2012.
- [12] M. M. Barroso, "Quantum Dots in Cell Biology," 2011.
- [13] W. C. W. Chan, D. J. Maxwell, X. Gao, R. E. Bailey, M. Han, and S. Nie, "Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 13, pp. 40–46, 2002.
- [14] Hartmut Haug and S. W. Koch, *Quantum Theory of the Optical and Electronic Properties of Semiconductors*. 1994.
- [15] U. Resch-genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-jaricot, R. Nitschke, and T. Nann, "Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels," vol. 5, no. 9, 2008.
- [16] I. Díez and R. H. Ras, A., "Fluorescent silver nanoclusters," *Nanoscale*, vol. 3, no. 5, 2011.

- [17] B. Bruhn, "Fabrication and characterization of single luminescing quantum dots from 1D silicon nanostructures," Royal Institute of Technology, Stockholm, 2012.
- [18] W. Cho, "Synthesis of Silicon Nanocrystals," vol. 42, no. February, pp. 629–632, 2003.
- [19] N. Mansour, A. Momeni, R. Karimzadeh, and M. Amini, "Blue-green luminescent silicon nanocrystals fabricated by nanosecond pulsed laser ablation in dimethyl sulfoxide," vol. 2, no. 6, pp. 3829–3837, 2012.
- [20] X. Xu, R. Ray, Y. Gu, H. J. Ploehn, L. Gearheart, K. Raker, and W. A. Scrivens, "Electrophoretic Analysis and Purification of Fluorescent Single-Walled Carbon Nanotube Fragments," pp. 12736–12737, 2004.
- [21] H. Li, Z. Kang, Y. Liu, and S.-T. Lee, "Carbon nanodots: synthesis, properties and applications," *J. Mater. Chem.*, vol. 22, no. 46, p. 24230, 2012.
- [22] S. N. Baker and G. a Baker, "Luminescent carbon nanodots: emergent nanolights.," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 49, no. 38, pp. 6726–44, Sep. 2010.
- [23] H. Zhu, X. Wang, Y. Li, Z. Wang, F. Yang, and X. Yang, "Microwave synthesis of fluorescent carbon nanoparticles with electrochemiluminescence properties.," *Chem. Commun. (Camb)*, no. 34, pp. 5118–20, Sep. 2009.
- [24] S.-T. Yang, X. Wang, H. Wang, F. Lu, P. G. Luo, L. Cao, M. J. Meziani, J.-H. Liu, Y. Liu, M. Chen, Y. Huang, and Y.-P. Sun, "Carbon Dots as Nontoxic and High-Performance Fluorescence Imaging Agents," *J. Phys. Chem. C Nanomater. interfaces*, vol. 113, no. 42, pp. 18110–18114, 2009.
- [25] H. Gonçalves, P. a. S. Jorge, J. R. a. Fernandes, and J. C. G. Esteves da Silva, "Hg(II) sensing based on functionalized carbon dots obtained by direct laser ablation," *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 145, no. 2, pp. 702–707, Mar. 2010.
- [26] Q.-L. Zhao, Z.-L. Zhang, B.-H. Huang, J. Peng, M. Zhang, and D.-W. Pang, "Facile preparation of low cytotoxicity fluorescent carbon nanocrystals by electrooxidation of graphite.," *Chem. Commun. (Camb)*, no. 41, pp. 5116–8, Nov. 2008.
- [27] R. Ye, C. Xiang, J. Lin, Z. Peng, K. Huang, Z. Yan, N. P. Cook, E. L. G. Samuel, C.-C. Hwang, G. Ruan, G. Ceriotti, A.-R. O. Raji, A. a Martí, and J. M. Tour, "Coal as an abundant source of graphene quantum dots.," *Nat. Commun.*, vol. 4, p. 2943, Dec. 2013.
- [28] J. Zhou, Z. Sheng, H. Han, M. Zou, and C. Li, "Facile synthesis of fluorescent carbon dots using watermelon peel as a carbon source," *Mater. Lett.*, vol. 66, no. 1, pp. 222–224, Jan. 2012.
- [29] X. He, H. Li, Y. Liu, H. Huang, Z. Kang, and S.-T. Lee, "Water soluble carbon nanoparticles: hydrothermal synthesis and excellent photoluminescence properties.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 87, no. 2, pp. 326–32, Oct. 2011.
- [30] H. Yan, M. Tan, D. Zhang, F. Cheng, H. Wu, M. Fan, X. Ma, and J. Wang, "Development of multicolor carbon nanoparticles for cell imaging.," *Talanta*, vol. 108, pp. 59–65, Apr. 2013.

- [31] H. Li, X. He, Y. Liu, H. Huang, S. Lian, S.-T. Lee, and Z. Kang, "One-step ultrasonic synthesis of water-soluble carbon nanoparticles with excellent photoluminescent properties," *Carbon N. Y.*, vol. 49, no. 2, pp. 605–609, Feb. 2011.
- [32] S. C. Ray, A. Saha, R. Sarkar, and N. R. Jana, "Fluorescent Carbon Nanoparticle : Synthesis , Characterization and Bio-imaging Application," *J. Phys. Chem. C*, no. 43, pp. 18546–18551, 2009.
- [33] J. C. G. Esteves da Silva and H. M. R. Gonçalves, "Analytical and bioanalytical applications of carbon dots," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 30, no. 8, pp. 1327–1336, Sep. 2011.
- [34] Y.-P. Sun, B. Zhou, Y. Lin, W. Wang, K. a S. Fernando, P. Pathak, M. J. Meziani, B. a Harruff, X. Wang, H. Wang, P. G. Luo, H. Yang, M. E. Kose, B. Chen, L. M. Veca, and S.-Y. Xie, "Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, no. 24, pp. 7756–7, Jun. 2006.
- [35] H. Li, X. He, Z. Kang, H. Huang, Y. Liu, J. Liu, S. Lian, C. H. a Tsang, X. Yang, and S.-T. Lee, "Water-soluble fluorescent carbon quantum dots and photocatalyst design.," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 49, no. 26, pp. 4430–4, Jun. 2010.
- [36] N. Ma, C. Ma, C. Li, T. Wang, Y. Tang, H. Wang, X. Mou, Z. Chen, and N. He, "Influence of Nanoparticle Shape, Size, and Surface Functionalization on Cellular Uptake," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 13, no. 10, p. 14, 2013.
- [37] C. Ding, A. Zhu, and Y. Tian, "Functional Surface Engineering of C-Dots for Fluorescent Biosensing and in Vivo Bioimaging," *Acc. Chem. Res.*, vol. 47, no. 1, 2014.
- [38] X. Wen, P. Yu, Y. Toh, and J. Tang, "On the upconversion fluorescence in carbon nanodots and graphene quantum dots," *R. Soc. Chem.*, vol. 50, pp. 4703–4706, 2014.
- [39] L. Cao, X. Wang, M. J. Meziani, F. Lu, H. Wang, P. G. Luo, Y. Lin, B. a Harruff, L. M. Veca, D. Murray, S.-Y. Xie, and Y.-P. Sun, "Carbon dots for multiphoton bioimaging.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 37, pp. 11318–9, Sep. 2007.
- [40] C. Liu, P. Zhang, F. Tian, W. Li, F. Li, and W. Liu, "One-step synthesis of surface passivated carbon nanodots by microwave assisted pyrolysis for enhanced multicolor photoluminescence and," *J. Mater. Chem.*, no. C, pp. 13163–13167, 2011.
- [41] X. Zhai, P. Zhang, C. Liu, T. Bai, and W. Li, "Highly luminescent carbon nanodots by microwave-assisted pyrolysis," *Chem. Commun.*, no. 48, pp. 7955–7957, 2012.
- [42] S. Yang, L. Cao, P. G. Luo, F. Lu, X. Wang, and H. Wang, "Carbon Dots for Optical Imaging in Vivo," pp. 11308–11309, 2009.
- [43] Z. Yang, Z. Li, and M. Xu, "Controllable Synthesis of Fluorescent Carbon Dots and Their Detection Application as Nanoprobes," vol. 5, no. 4, pp. 247–259, 2013.
- [44] F. Du, Y. Ming, F. Zeng, C. Yu, and S. Wu, "A low cytotoxic and ratiometric fluorescent nanosensor based on carbon-dots for intracellular pH sensing and mapping.," *Nanotechnology*, vol. 24, no. 36, p. 365101, Sep. 2013.

- [45] B. Gersten, "Solvothelmal Synthesis of Nanoparticles," *Chemfiles*, vol. 5, no. 13.
- [46] X. Ren, J. Liu, X. Meng, J. Wei, T. Liu, and F. Tang, "Synthesis of Ultra-Stable Fluorescent Carbon Dots from Polyvinylpyrrolidone and Their Application in the Detection of Hydroxyl Radicals.," *Chem. Asian J.*, pp. 1–7, Feb. 2014.
- [47] S. Zhu, Q. Meng, L. Wang, J. Zhang, Y. Song, H. Jin, K. Zhang, H. Sun, H. Wang, and B. Yang, "Highly photoluminescent carbon dots for multicolor patterning, sensors, and bioimaging.," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 52, no. 14, pp. 3953–7, Apr. 2013.
- [48] Q. Liang, W. Ma, Y. Shi, Z. Li, and X. Yang, "Easy synthesis of highly fluorescent carbon quantum dots from gelatin and their luminescent properties and applications," *Carbon N. Y.*, vol. 60, pp. 421–428, 2013.
- [49] A. D. McNaught and A. Wilkinson, *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology*, 2nd editio. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997.
- [50] F. J. Holler, S. R. Crouch, D. A. Skoog, and D. M. West, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Ninth edit. New York, NY: Saunders College Publishing, 2013, p. 976.
- [51] K. Rege and I. Medintz, *Methods in Bioengineering: Nanoscale Bioengineering and Nanomedicine*. Artech House, 2009, p. 347.
- [52] P. T. So and C. Y. Dong, "Fluorescence Spectrophotometry," *Encycl. Life Sci.*, pp. 1–4, 2002.
- [53] S.-L. Hu, K.-Y. Niu, J. Sun, J. Yang, N.-Q. Zhao, and X.-W. Du, "One-step synthesis of fluorescent carbon nanoparticles by laser irradiation," *J. Mater. Chem.*, vol. 19, no. 4, p. 484, 2009.
- [54] K. D. Vernon-Parry, "Scanning Electron Microscopy : an introduction," *III-Vs Rev.*, vol. 13, no. 4, pp. 40–44, 2000.
- [55] Y. Sun, "Investigating Static and Dynamic Light Scattering," no. 1, pp. 1–13, 2011.
- [56] K. Mattison, A. Morfesis, and M. Kaszuba, "A Primer on Particle Sizing Using Dynamic Light Scattering," no. December, 2003.
- [57] B. J. Frisken, "Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data," vol. 40, no. 24, pp. 4087–4091, 2001.
- [58] B. Fultz and J. Howe, *Transmission Electron Microscopy and Diffractometry of Materials*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, p. 761.
- [59] M. N. Dole, P. A. Patel, S. D. Sawant, and P. S. Shedpure, "Advance Applications Of Fourier Transform Infrared Spectroscopy," vol. 7, no. 2, 2011.
- [60] R. J. Hunter, *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*. San Diego: Academic Press, 1981.
- [61] B. De and N. Karak, "A green and facile approach for the synthesis of water soluble fluorescent carbon dots from banana juice," *RSC Adv.*, vol. 3, no. 22, p. 8286, 2013.

- [62] L. Xiao, Z. Shi, F. Xu, and R. Sun, "Bioresource Technology Hydrothermal carbonization of lignocellulosic biomass," *Bioresour. Technol.*, vol. 118, pp. 619–623, 2012.
- [63] R. Zhang, Y. Liu, L. Yu, Z. Li, and S. Sun, "Preparation of high-quality biocompatible carbon dots by extraction, with new thoughts on the luminescence mechanisms.," *Nanotechnology*, vol. 24, no. 22, p. 225601, Jun. 2013.
- [64] K. Sivaiah, K. N. Kumar, and V. N. S. Buddhudu, "Structural and Optical Properties of Li+: PVP & Ag+: PVP Polymer Films," *Mater. Sci. Appl.*, vol. 02, no. 11, pp. 1688–1696, 2011.
- [65] J. Coates, "Interpretation of Infrared Spectra , A Practical Approach," *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, pp. 10815–10837, 2000.
- [66] J. B. Lambert, H. F. Shurvell, and R. G. Cooks, *Introduction to organic spectroscopy*. Macmillan N.Y., 1987, p. 454.
- [67] B. C. Smith, *Infrared Spectral Interpretation: A Systematic Approach*, 1st Editio. CRC Press, 1998, p. 288.
- [68] M. Balci, *Basic 1H- and 13C-NMR Spectroscopy*, First Edit. Elsevier, 2005, p. 430.
- [69] G. R. Fulmer, A. J. M. Miller, N. H. Sherden, H. E. Gottlieb, A. Nudelman, B. M. Stoltz, J. E. Bercaw, and K. I. Goldberg, "NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist," *Organometallics*, vol. 29, no. 9, pp. 2176–2179, May 2010.
- [70] R. Smith and H. C. Howard, "Aromatization of Cellulose by Heat," vol. 59, no. 46, pp. 234–236, 1937.
- [71] A. Verma and F. Stellacci, "Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions.," *Small*, vol. 6, no. 1, pp. 12–21, Jan. 2010.
- [72] P. Hsu and H. Chang, "Synthesis of high-quality carbon nanodots from hydrophilic compounds : role of functional groups w," *Chem. Commun.*, no. 48, pp. 3984–3986, 2012.
- [73] S. K. Bhunia, A. Saha, A. R. Maity, S. C. Ray, and N. R. Jana, "Carbon nanoparticle-based fluorescent bioimaging probes.," *Sci. Rep.*, vol. 3, p. 1473, Jan. 2013.

Apêndices

Apêndice A – Análise estrutural de precursores moleculares e CNPs

Neste apêndice é feita a análise FTIR dos precursores moleculares usados em síntese hidrotérmica e a análise FTIR das CNPs PAA e CNPs G. Esta análise demonstrou ser uma valiosa fonte de informação na medida em que permite investigar as alterações estruturais decorrentes do tratamento hidrotérmico. É apresentada a estrutura molecular dos precursores (desenhadas com o *ChemDraw*), o espectro FTIR e a análise estrutural respectiva. O espectro FTIR da etilenodiamina foi retirado da literatura e os seus picos não foram identificados.

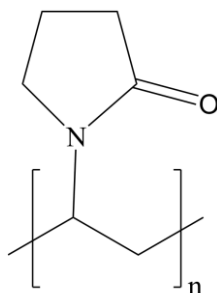


Figura A.1 – Estrutura química da PVP.

Tabela A.1 – Atribuição de picos FTIR ao PVP.

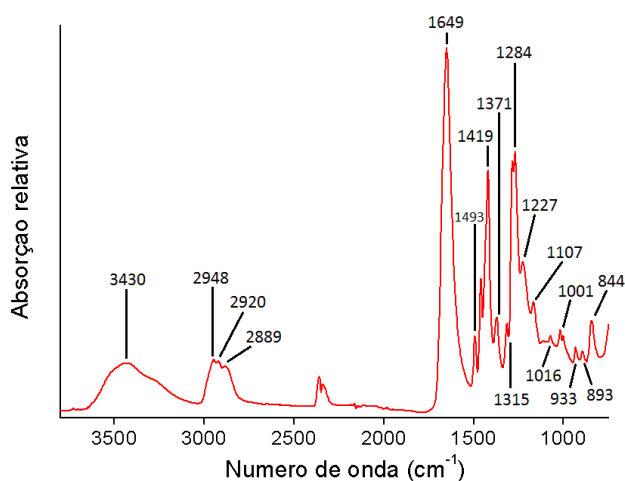


Figura A.2 – Espectro FTIR da PVP.

Absorção (cm ⁻¹)	Ligação	Modo de vibração	Grupo funcionais
844	C-H	Deformação	Alcano
893	C-H	Deformação	Alcano
933	C-H	Deformação	Alcano
1001	C-H	Deformação	Alcano
1016	C-H	Deformação	Alcano
1107	C-N	Deformação	Amida
1227	C-N	Deformação	Amida
1284	C-H	Deformação	Alcano
1315	C-H	Deformação	Alcano
1371	C-H	Deformação	Alcano
1419	C-H	Deformação	Alcano
1493	C-H	Estiramento	Alcano
1649	C=O	Estiramento	Amida I
2889	C-H	Estiramento	Alcano
2920	C-H	Estiramento	Alcano
2948	C-H	Estiramento	Alcano
3430	O-H	Estiramento	Água

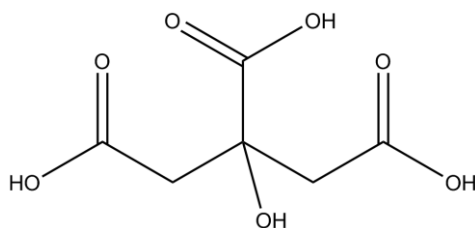


Figura A.3 – Estrutura química do ácido cítrico.

Tabela A.2 – Atribuição de picos FTIR ao ácido cítrico.

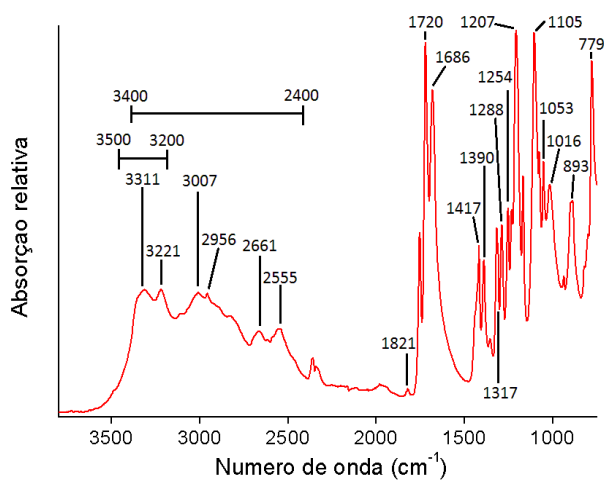


Figura A.4 – Espectro FTIR do ácido cítrico.

Absorção (cm ⁻¹)	Ligação	Modo de vibração	Grupos funcionais
779	C-H	Deformação	Alcano
893	C-H	Deformação	Alcano
1016	C-H	Deformação	Alcano
1053	C-O	Estiramento	Álcool prim.
1105	C-O	Estiramento	Álcool
1207	C-O	Estiramento	Álcool
	C-O	Estiramento	Ácido carb.
1254	O-H	Deformação	Álcool
	C-O	Estiramento	Ácido carb.
1288	C-O	Estiramento	Ácido carb.
1317	C-O	Estiramento	Ácido carb.
1390	O-H	Deformação	Ácido carb.
	C-H	Deformação	Alcano
1417	O-H	Deformação	Ácido carb.
	C-H	Deformação	Alcano
1686	?	?	?
1720	C=O	Estiramento	Ácido carb.
1821	?	?	?
2555	?	?	?
2661	?	?	?
2956	C-H	Estiramento	Alcano
3007	C-H	Estiramento	Alcano
3221	?	?	?
3311	?	?	?
[3400-2400]	O-H	Estiramento	Ácido carb.
[3500-3200]	O-H	Estiramento	Álcool

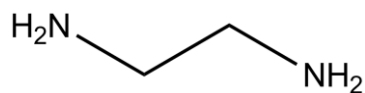


Figura A.5 – Estrutura química da etilenodiamina.

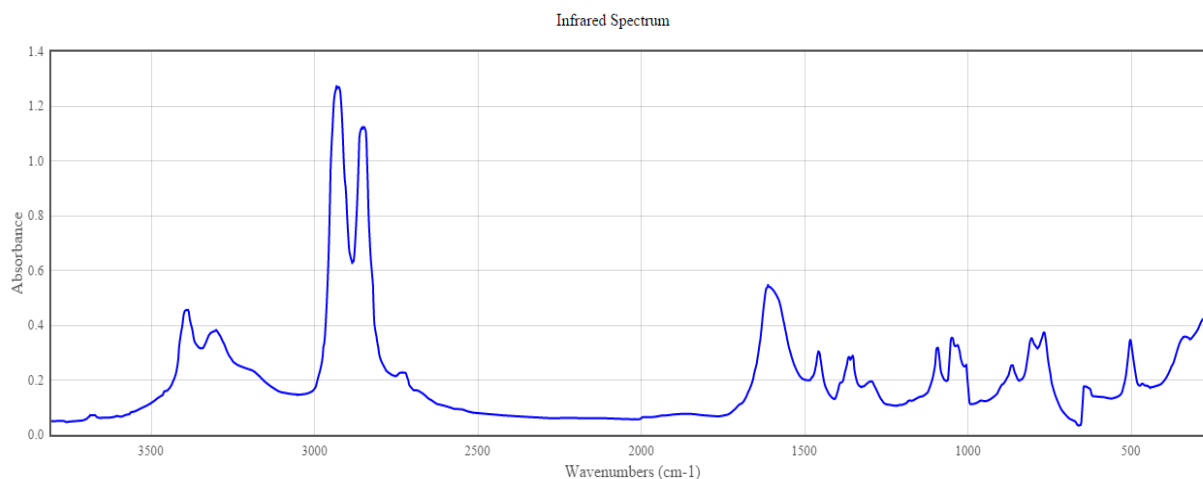


Figura A.6 – Espectro FTIR da etilenodiamina. Retirado da base de dados electrónica da National Institute of Standards and Terminology: ” <http://www.nist.gov/>”.

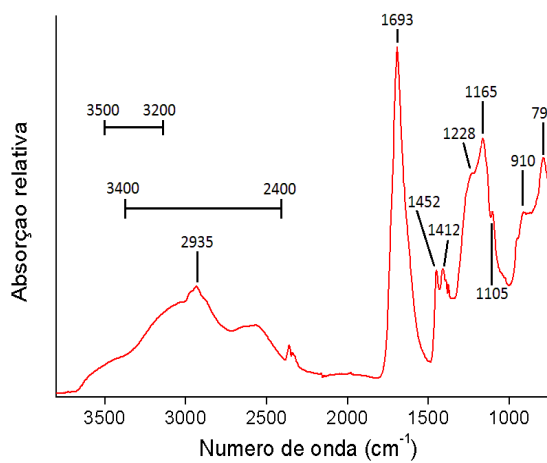


Figura A.7 – Espectro FTIR do PAA.

Tabela A.3 – Atribuição de picos FTIR ao PAA.

Absorção (cm ⁻¹)	Ligação	Modo de vibração	Grupos funcionais
791	C-H	Deformação	Alcano
910	C-H	Deformação	Alcano
1105	C-O	Estiramento	Ácido carb.
1165	C-O	Estiramento	Ácido carb.
1228	C-O	Estiramento	Ácido carb.
1412	C-H	Deformação	Alcano
1452	C-H	Deformação	Alcano
1693	C=O	Estiramento	Ácido carb.
2935	C-H	Estiramento	Alcano
[3400-2400]	O-H	Estiramento	Ácido carb.

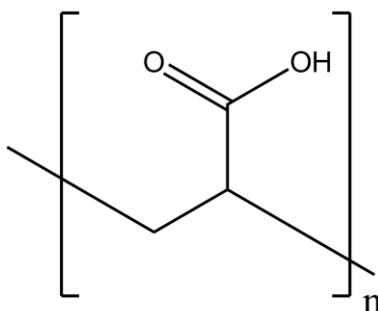


Figura A.8 – Estrutura química do PAA.

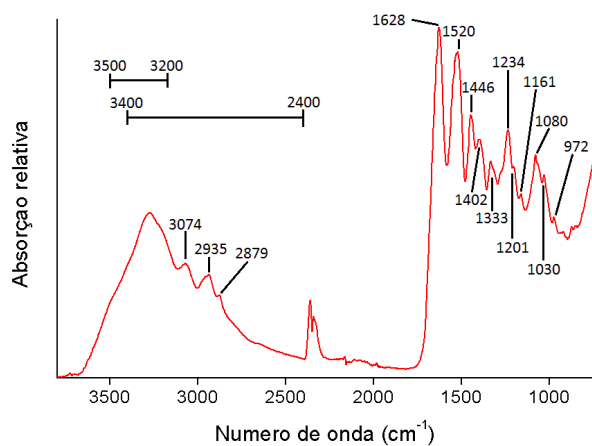


Figura A.9 – Espectro FTIR da gelatina.

Tabela A.4 – Atribuição de picos FTIR à gelatina.

Absorção (cm ⁻¹)	Ligação	Modo de vibração	Grupos funcionais
972	C-H	Deformação	Alcano
	C-H	Deformação	Aromático
1030	C-O	Estiramento	Álcool
1080	C-O	Estiramento	Álcool
1161	C-N	Estiramento	Amina
1201	C-N	Estiramento	Amina
1234	C-N	Estiramento	Amina
	C-O	Estiramento	Ácido carb.
1333	C-N	Estiramento	Amina
	O-H	Deformação	Álcool
1402	C-H	Deformação	Alcano
1446	C-H	Deformação	Alcano
	C-N	Estiramento	Amida III
1520	C=C	Estiramento	Aromático
	N-H	Deformação	Amida II
1628	C=O	Estiramento	Amida I
2879	C-H	Estiramento	Alcano
2935	C-H	Estiramento	Alcano
3074	C-H	Estiramento	Aromático
[3400-2400]	O-H	Estiramento	Ácido carb.
[3500-3200]	N-H	Estiramento	Amida A
	O-H	Estiramento	Álcool
	O-H	Estiramento	Água

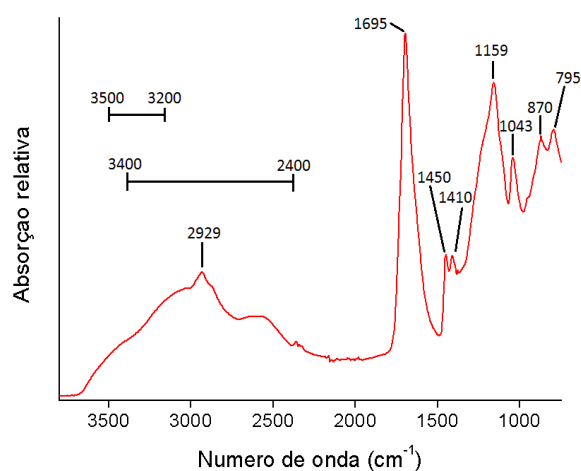


Figura A.10 – Espectro FTIR de CNPs PAA.

Tabela A.5 – Atribuição de picos a CNPs PAA.

Absorção (cm ⁻¹)	Ligação	Modo de vibração	Grupo funcional
795	C-H	Deformação	Alcano
870	C-H	Deformação	Alcano
1043	C-O	Estiramento	Álcool
1159	C-O	Estiramento	Ácido carb.
1410	C-H	Deformação	Alcano
1450	C-H	Deformação	Alcano
1695	C=O	Estiramento	Ácido carb.
2929	C-H	Estiramento	Alcano
[3400-2400]	O-H	Estiramento	Ácido carb.
[3500-3200]	O-H	Estiramento	Água

A análise FTIR para o espectro das CNPs PAA é idêntica à feita para as CNPs PVP. Os espectros IV da amostra de NPs (figura A.10) e do PAA são semelhantes (ver figura A.7). Os ácidos

carboxílicos do PAA estão claramente presentes. Provavelmente, da reacção hidrotérmica resultaram CNPs com composição semelhante à do polímero e uma fracção desconhecida de polímero residual.

A diferença mais evidente relativamente ao espectro FTIR do PAA é o surgimento de um pico a 1043cm^{-1} atribuído a uma ligação C-O. Esta ligação pode surgir devido à formação de ligações C-O de álcoois. O pico também pode ser atribuído a éteres. A região de absorção da ligação O-H de álcoois a 3500 a 3200cm^{-1} não evidencia diferenças significativas relativamente ao espectro FTIR do PAA e por isso é difícil inferir quanto à presença deste grupo funcional. O mais provável é esta banda aparecer devido à vibração O-H da água tanto na amostra de CNPs PAA como no próprio PAA (a amostra e o polímero são higroscópicos).

Tabela A.6 – Atribuição de picos a CNPs G.

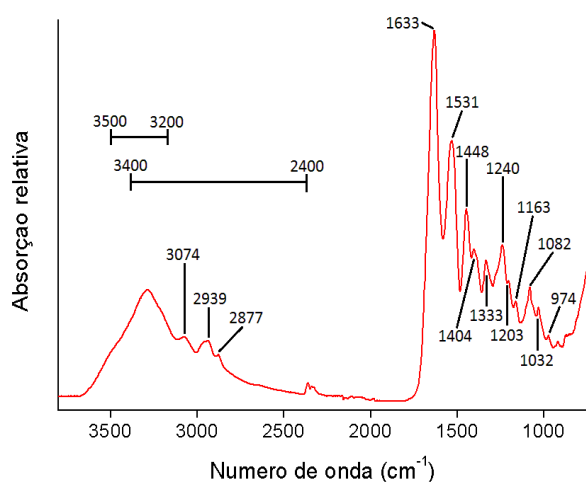


Figura A.11 – Espectro FTIR de CNPs G.

Absorção (cm^{-1})	Ligação	Modo de vibração	Grupos funcionais
974	C-H	Deformação	Alcano
	C-H	Deformação	Aromático
1032	C-O	Estiramento	Álcool
1082	C-O	Estiramento	Álcool
1163	C-N	Estiramento	Amina
1203	C-N	Estiramento	Amina
1240	C-N	Estiramento	Amina
	C-O	Estiramento	Ácido carb.
1333	C-N	Estiramento	Amina
	O-H	Deformação	Álcool
1404	C-H	Deformação	Alcano
1448	C-H	Deformação	Alcano
	C-N	Estiramento	Amida III
1531	C=C	Estiramento	Aromático
	N-H	Deformação	Amida II
1633	C=O	Estiramento	Amida I
2877	C-H	Estiramento	Alcano
2939	C-H	Estiramento	Alcano
3074	C-H	Estiramento	Aromático
[3400-2400]	O-H	Estiramento	Ácido carb.
[3500-3200]	N-H	Estiramento	Amida A
	O-H	Estiramento	Álcool
	O-H	Estiramento	Água

A partir do espectro FTIR das CNPs G (figura A.11) não se retira nenhuma evolução evidente da estrutura química da gelatina com o tratamento hidrotérmico (ver figura A.9). O espectro FTIR destas NPs é análogo ao espectro da gelatina. Apenas se observa a intensificação do pico a 1633cm^{-1} respeitante aos carbonilos de amidas. É provável que se tenham obtido CNPs de composição semelhante à da própria gelatina e que exista ainda bastante gelatina residual. A análise deste espectro acaba por ser análoga às feitas para CNPs PVP e CNPs PAA.

Apêndice B – Características da cortiça

No presente apêndice apresentam-se as características físicas da cortiça utilizada, a possível composição da cortiça e as estruturas químicas dos dois polímeros existentes em maior quantidade na cortiça, a suberina e a lignina.

Características Characteristics	Especificação Specification		Norma Norm
Massa Volúmica (kg/m3) Bulk density (kg/m3)	50 - 70		ISO 2031
Humidade (%) Moisture Content (%)	Opcional, de acordo com os termos do contrato Optional, according contract terms		ISO 2190
Distribuição Granulométrica (% de retenção) Size analysis by mechanical sieving (% of retention)	Crivos ASTM ASTM Sieves		ISO 2030
	(mesh)	(mm)	
	% Retidos % Retention		
	30	0,600	
	35	0,500	
	50	0,300	
	60	0,250	
	70	0,212	
Fundo / Under		0 - 10	

Figura B.1 – Características físicas dos grãos de cortiça usados em síntese de CNPs.

Tabela B.1 – Possíveis elementos estruturais da cortiça usada com respectiva proporção composicional.
Tabela retirada de: **S. Silva, M. Sabino, E. Fernandes, V. Correlo, L. Boesel e R. Reis**, "Cork: properties, capabilities and applications", International Materials Reviews, vol. 50, pp 345-365, 2005.

Component	Virgin cork		Reproduction cork (amadia)					
	Caldas (1986) ¹³	Pereira (1981) ³⁵	Gil (1998) ¹	Caldas (1986) ¹³	Pereira (1981) ³⁵	Parameswaran (1981) ^{13*}	Holloway (1972) ³⁸	Carvalho (1968) ^{13*}
Suberin	45	45	42	48	33.5	33	37	50
Lignin	27	21	21.5	29	26	13	14.8	19
Polysaccharides (cellulose and hemicellulose)	12	13	16	12	25	6		13
Extractables	10	19	13	8.5	13	24	15.8	15
Ash	5	1.2		2.1	2.5	...		3
Others	...	0.8	7	6

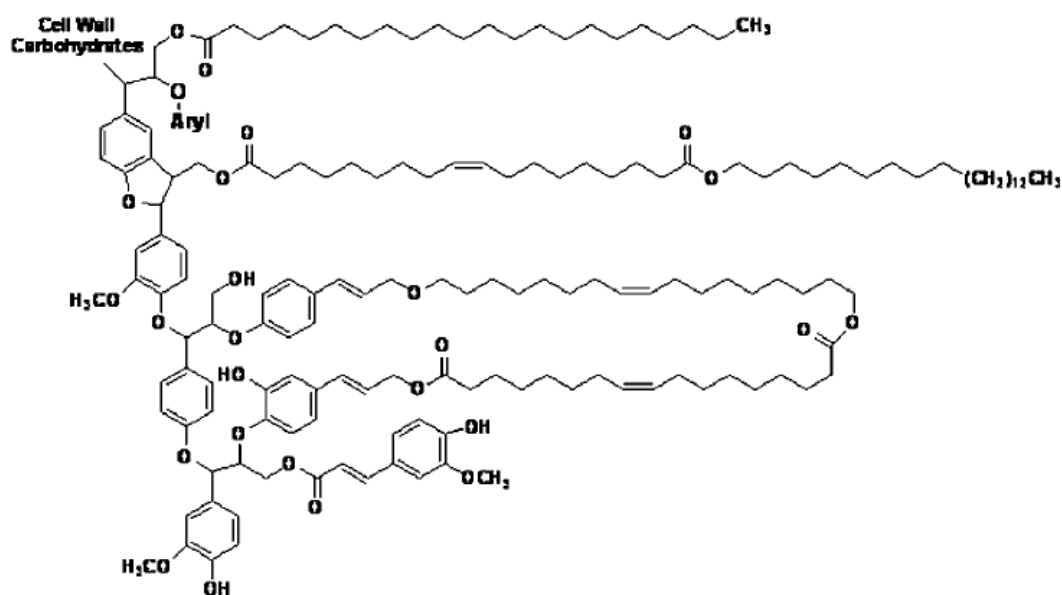


Figura B.2 – Possível estrutura química da suberina. Figura retirada de: **S. Silva, M. Sabino, E. Fernandes, V. Correlo, L. Boesel e R. Reis**, “*Cork: properties, capabilities and applications*”, International Materials Reviews, vol. 50, pp 345-365, 2005.

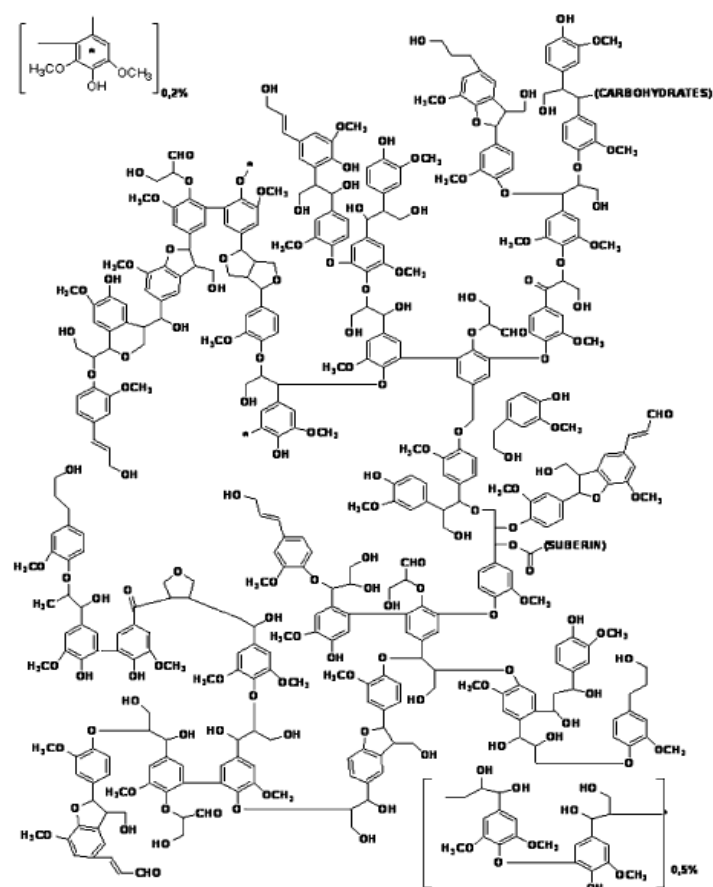


Figura B.3 – Possível estrutura química da lignina. Figura retirada de: **S. Silva, M. Sabino, E. Fernandes, V. Correlo, L. Boesel e R. Reis**, “*Cork: properties, capabilities and applications*”, International Materials Reviews, vol. 50, pp 345-365, 2005.

Apêndice C – Preparação e caracterização espectroscópica da solução de sulfato de quinino

Preparação da solução de sulfato de quinino em 0,1M H₂SO₄

1. Pipetou-se 0,555ml de H₂SO₄ para um balão volumétrico de 100ml
2. Adicionou-se água desionizada ao balão até à marca.
3. Com uma pequena espátula retirou-se uma pequena quantidade de sulfato de quinino a olho para um *ependorf*.
4. O sulfato de quinino foi dissolvido em 1ml de solução a 0,1M de H₂SO₄.
5. A solução foi passada para uma célula de quartzo à qual foi adicionada mais 1ml de solução a 0,1M de H₂SO₄.
6. Foi medida a absorvância desta solução.
7. Seguidamente foi feita a diluição necessária (absorvância varia linearmente com a concentração) para ajustar a absorvância da solução para 0,1 u.a. a 360nm.

Análise espectroscópica e cálculo de rendimentos quânticos de fluorescência.

Com a solução obtida com o procedimento anterior obtiveram-se os espectros de absorção (figura C.1) e fluorescência (figura C.2) do sulfato de quinino. Os espectros de fluorescência foram obtidos dos 300 aos 400nm de 10 em 10nm mas para facilitar a interpretação são exibidos em intervalos de 20nm. Os espectros de absorção foram adquiridos nas mesmas condições usadas para a obtenção de espectros das CNPs.

Os FQYs foram calculados a 360nm de acordo com a equação II.3. As absorvâncias são obtidas a partir dos dados dos espectros de absorção das amostras e as áreas dos espectros de fluorescência com excitação da amostra a 360nm são calculadas pelo *software* usado (OriginPro 8). O factor de correcção referente aos índices de refração dos solventes é dispensável pois usou-se sempre água desionizada como solvente. O cálculo de FQYs está sempre sujeito a grande erro experimental e por isso é apresentado sem casas decimais.

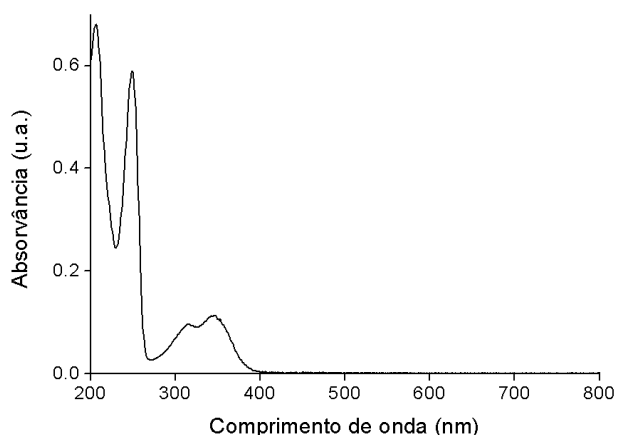


Figura C.1 – Espectro de absorção do sulfato de quinino.

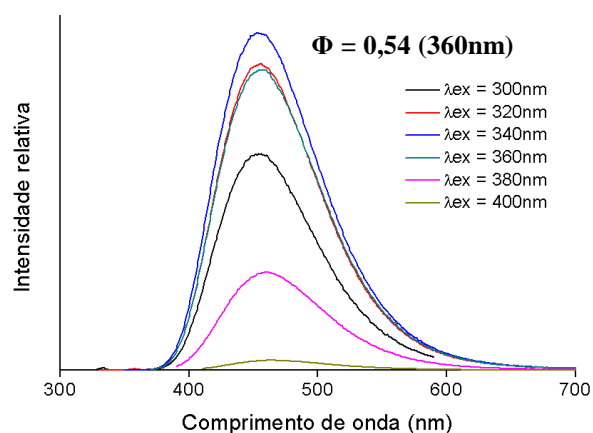


Figura C.2 – Espectros de emissão do sulfato de quinino.

Apêndice D – Culturas celulares

As linhas celulares usadas são conservadas em solução de meio e DMSO numa arca congeladora a -80°C. Para realizar as sementeiras é necessário descongelar as células e proceder à sua transferência para um T25 onde irão proliferar em meio de cultura celular.

Sementeiras celulares

Em todas as sementeiras foram usadas placas de 24 poços. O procedimento usado em todas sementeiras foi idêntico e é descrito seguidamente.

1. Verificar a morfologia das células no T25 ao microscópio para assegurar a viabilidade da cultura.
2. Retirar o meio do frasco T25 com uma pipeta de Pasteur sem arrastar o fundo onde as células estão aderidas.
3. Lavar o fundo do T25 com 5ml de PBS.
4. Tripsinar com 500µl de tripsina. Varrer bem o fundo onde as células estão aderidas.
5. Colocar o T25 com as células com a tripsina 5 minutos na incubadora a 37°C com atmosfera de CO₂ a 5%. Após os 5 minutos de incubação, bater suavemente no frasco para as células se soltarem.
6. Confirmar ao microscópio se as células ficaram em suspensão.
7. Adicionar 5ml de meio. Aspirar e repor a solução 3 vezes passando pelo fundo onde as células estiveram aderidas.
8. Passar a solução com meio e células para um tubo Falcon de 15ml.
9. Retirar 50µl de solução de meio e células para um microtubo.
10. Adicionar 50µl de solução de azul tripano ao microtubo.
11. Aspirar e repor a solução várias vezes para homogeneizar a mistura.
12. Inserir a solução corada no hemocitómetro.
13. Contar o número de células em viáveis em cada câmara e estimar o número total de células por mililitro na suspensão através da equação D.1:

$$\frac{\text{nº de células contadas viáveis}}{\text{número de quadriculas com } 0,1\text{mm}^3} \times \text{diluição com azul tripano} \times 10^4 \quad \text{Equação D.1}$$

14. Adicionar a solução com as células a um tubo Falcon de 50ml.
15. Fazer a diluição necessária com meio (depende do número de células contadas e do número de células que se deseje semear por poço). Agitar revirando o tubo para cima e para baixo sucessivamente.
16. Adicionar uma lamela a cada poço da placa usado.
17. Adicionar 1ml de solução a cada poço.
18. Inserir a placa na incubadora a 37°C com atmosfera a 5% de CO₂.

Apêndice E – Controlos de autofluorescência celular

Os controlos de autofluorescência celular foram feitos com células não marcadas. É feita a aquisição de imagens de microscopia em modo de contraste de fase com ampliação a 100× e aquisição de imagens de MF na mesma zona com a mesma ampliação.

Células Saos-2



Figura E.1 – Imagem de contraste de fase de células Saos-2 com ampliação de 100×.



Figura E.2 – Imagem da autofluorescência de células Saos-2 com ampliação de 100× (excitação no UV próximo). Tempo de exposição de 1,6s na aquisição.

Células HFFF2

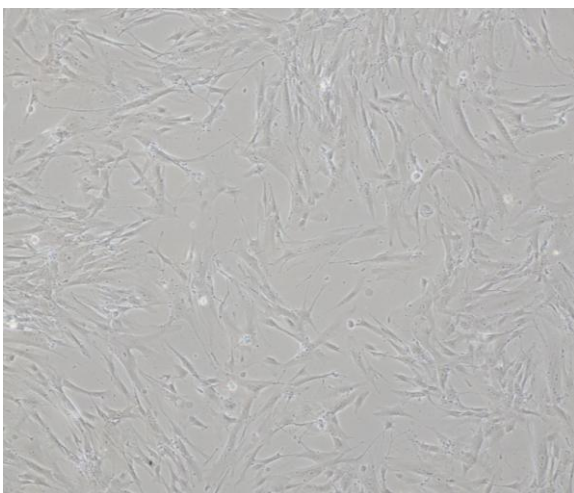


Figura E.3 – Imagem de contraste de fase de células HFFF2 com ampliação de 100×.

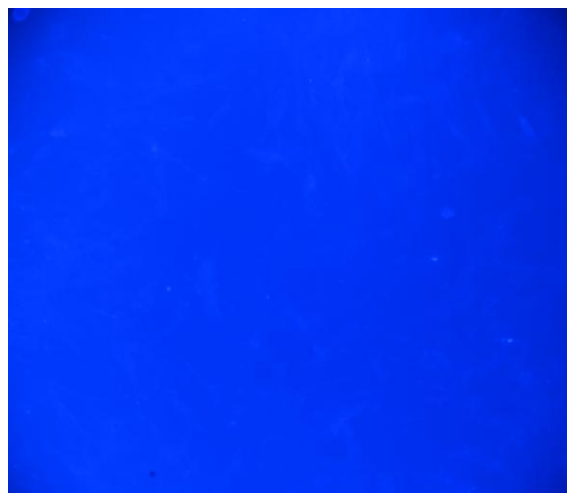


Figura E.4 – Imagem da autofluorescência de células HFFF2 com ampliação de 100× (excitação no UV próximo). Tempo de exposição de 3s na aquisição.

Apêndice F – Tentativa de funcionalização com hidrocloreto de L-cisteína-etil-éster

O objectivo do procedimento de funcionalização foi a investigação da facilidade de manipulação da estrutura química na superfície das CNPs 300 e eventuais alterações no comportamento óptico destas CNPs.

Era esperada a substituição de grupos carbonilo e hidroxilo por moléculas de hidrocloreto de L-cisteína-etil-éster (L-CEEH) através da ligação destes grupos funcionais às moléculas. A formação de uma ligação amida entre o grupo amina da L-CEEH e um grupo carboxilo é viável a temperaturas moderadas. As ligações amida, uma vez formadas, são muito estáveis. Para potenciar o ataque nucleófilo da amina neutralizou-se a solução com hidróxido de sódio antes do tratamento térmico. Em vez de se optar por um refluxo, a funcionalização foi feita em meio hidrotérmico em condições moderadas ($T=120^{\circ}\text{C}$) de forma a acelerar as reacções de funcionalização.

Obteve-se uma solução de cor amarela com fluorescência de cor azul esverdeada o que pode indicar que houve funcionalização (figura F.1 C). No entanto, foi feita uma síntese controlo em que se fez o tratamento hidrotérmico de uma solução de L-CEEH neutralizada com uma concentração idêntica à usada no procedimento de funcionalização. O resultado deste controlo foi a obtenção de uma solução com a mesma cor e com a mesma fluorescência da suposta solução funcionalizada (figura F.1 B).

Comparando a imagem SEM das CNPs 300 (figura III.41) com a imagem SEM das supostas NPs funcionalizadas (figura F.3) verifica-se que os tamanhos das CNPs não são compatíveis. A medição de tamanhos com o *ImageJ* é dificultada pela dificuldade de distinção dos limites das CNPs nos agregados formados na secagem (mas foram medidos mais tamanhos que os apresentados na tabela F.1). No entanto, a observação anterior parece ser válida (foram tiradas mais duas imagens SEM que suportam esta linha de pensamento). Apesar de não se poder concluir que não houve funcionalização temos porém um grande grau de certeza que existe contaminação da fluorescência por NPs derivadas de L-CEEH.

Na literatura não foram encontradas quaisquer alusões a procedimentos de síntese hidrotérmica de CNPs a temperaturas tão baixas. Existem algumas referências que descrevem processos de funcionalização em refluxo durante longos períodos de tempo. A temperatura usada nesta tentativa de funcionalização é idêntica às usadas em refluxo e, portanto, insuspeita de gerar NPs. O factor chave deverá ter sido a pressão, mesmo apesar de esta ser comparativamente muito menor que a gerada nas outras sínteses hidrotérmicas, quer por efeitos de temperatura, quer por efeitos de volume de fluido no interior do reactor. Assim, em retrospectiva, deveria ter-se decidido pela implementação de um procedimento de funcionalização por refluxo ou por um método de *crosslinking*. No entanto, não deixa de ser interessante a síntese de CNPs a condições de temperatura e pressão relativamente baixas. Comparando os espectros da figura III.19 com os espectros da figura F.2 parece claro que são estas CNPs produzidas por acaso que possuem o máximo absoluto de emissão no verde, característica espectroscópica que lhes é exclusiva.

Caracterização por espectroscopia de fluorescência

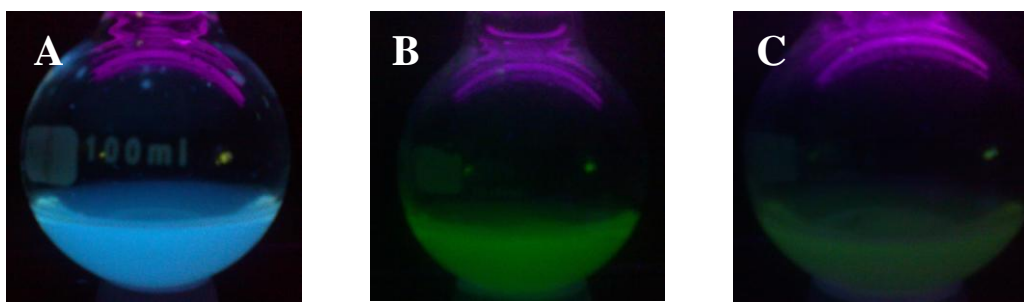


Figura F.1 – Imagens à lâmpada UV de CNPs 300 (A), CNPs L-CEEH (B) e CNPs 300 + CNPs L-CEEH (C).

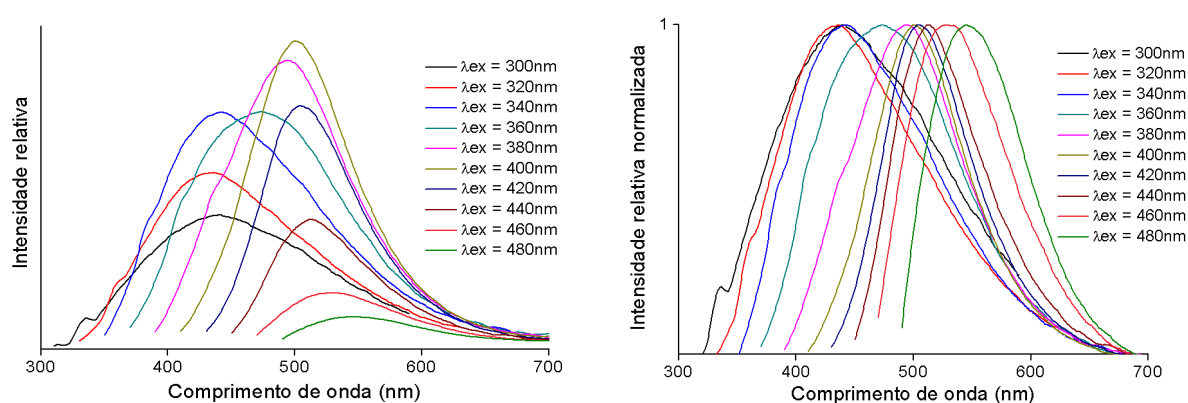


Figura F.2 – Espectros de fluorescência da solução com CNPs 300 + CNPs de L-CEEH e respectivos espectros normalizados.

Imagem de microscopia electrónica de varrimento

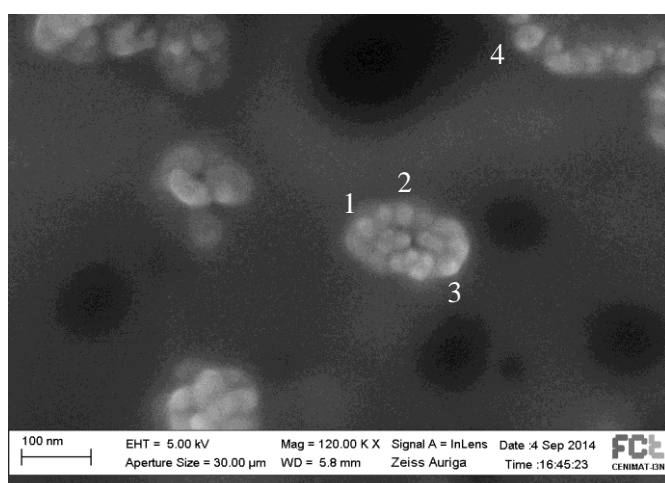


Tabela F.1 – Tamanhos SEM de CNPs 300 e CNPs de L-CEEH.

Exemplar	Dimensão (nm)
1	29
2	28
3	31
4	38

Figura F.3 – Imagem SEM de CNPs 300 e CNPs de L-CEEH.